(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7300201号
(P7300201)

(45)発行日　令和5年6月29日(2023.6.29)

(24)登録日　令和5年6月21日(2023.6.21)

(51)国際特許分類
Ｇ０１Ｎ　21/64　(2006.01)

ＦＩ
Ｇ０１Ｎ　21/64　Ｇ

請求項の数　19　（全35頁）

(21)出願番号　特願2021-566880(P2021-566880)
(86)(22)出願日　令和2年11月4日(2020.11.4)
(86)国際出願番号　PCT/JP2020/041153
(87)国際公開番号　WO2021/131331
(87)国際公開日　令和3年7月1日(2021.7.1)
審査請求日　令和4年4月25日(2022.4.25)
(31)優先権主張番号　特願2019-231043(P2019-231043)
(32)優先日　令和1年12月23日(2019.12.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　301023238
国立研究開発法人物質・材料研究機構
茨城県つくば市千現一丁目２番地１
(74)代理人　100206829
弁理士　相田 悟
(72)発明者　岩長 祐伸
茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内
審査官　吉田 将志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　蛍光検出用生体分子検査チップ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

メタ表面を有する第１の基板と、

前記第１の基板と対向して位置し、マイクロ流路を有する第２の基板と

を備え、

前記メタ表面は、検出されるべき生体分子の固定を効率化する間隙を有すると共に、前記生体分子が発する蛍光の波長範囲を含む領域において蛍光増強を示し、

前記第２の基板は、可視光または近赤外光を透過する材料からなり、

前記第１の基板と前記第２の基板との間で前記蛍光が共振する、蛍光検出用生体分子検査チップ。

【請求項２】

前記メタ表面は、金属の相補的積層構造またはナノロッド構造である、請求項１に記載の検査チップ。

【請求項３】

前記蛍光増強は、可視光領域または近赤外光領域における波長を有する光の強度の増強である、請求項１または２に記載の検査チップ。

【請求項４】

前記第１の基板と前記第２の基板とにより形成されるマイクロ流路の高さは、１０μｍ以上１００μｍ以下の範囲である、請求項１～３のいずれかに記載の検査チップ。

【請求項５】

前記第１の基板と前記第２の基板とにより形成されるマイクロ流路の高さは、１５μｍ以上５０μｍ以下の範囲である、請求項４に記載の検査チップ。
【請求項６】
前記メタ表面は、前記金属の相補的積層構造であり、
前記金属の相補的積層構造は、基材と、前記基材の表面に位置するスラブ材と、少なくとも前記スラブ材上に位置する金属材料とを含み、
前記基材は、少なくとも前記スラブ材と接する表面層を備え、
前記スラブ材は、前記表面層の屈折率よりも高い屈折率を有する材料からなると共に、その表面から前記基材の前記表面層に達する、周期的に配列した複数の穴を有し、
前記金属材料は、前記スラブ材の表面、および、前記複数の穴の底面を形成する前記基材の表面層上にそれぞれ位置する、請求項２に記載の検査チップ。
【請求項７】
前記金属材料は、ドルーデ金属に近似できる複素誘電率を有する物質である、請求項６に記載の検査チップ。
【請求項８】
前記ドルーデ金属に近似できる複素誘電率を有する物質は、金（Ａｕ）、銀（Ａｇ）、銅（Ｃｕ）、アルミニウム（Ａｌ）、白金（Ｐｔ）、チタン（Ｔｉ）、ニッケル（Ｎｉ）、および、これらの合金からなる群から選択される、請求項７に記載の検査チップ。
【請求項９】
前記複数の穴は、２以上の異なる直径を有する円孔、もしくは２以上の異なる一辺の長さを有する角柱状孔であり、かつ／または、２以上の異なる周期で配列されている、請求項６～８のいずれかに記載の検査チップ。
【請求項１０】
前記複数の穴の周期は、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲である、請求項６～９のいずれかに記載の検査チップ。
【請求項１１】
前記複数の穴の直径または一辺の長さは、１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲である、請求項６～１０のいずれかに記載の検査チップ。
【請求項１２】
前記スラブ材の厚さは、１００ｎｍ以上２μｍ以下の範囲である、請求項６～１１のいずれかに記載の検査チップ。
【請求項１３】
前記メタ表面は、前記ナノロッド構造であり、
前記ナノロッド構造は、基材と、前記基材の表面に周期的に起立する複数のナノロッドとを備え、
前記基材は、前記複数のナノロッドの屈折率よりも小さい屈折率を有する材料からなる、請求項２に記載の検査チップ。
【請求項１４】
前記基材は、１以上１．６以下の屈折率を有する材料からなり、
前記複数のナノロッドは、２以上５以下の屈折率を有する半導体または誘電体からなる、請求項１３に記載の検査チップ。
【請求項１５】
前記半導体または誘導体は、シリコン、ゲルマニウム、窒化ガリウム、および、二酸化チタンからなる群から選択される、請求項１４に記載の検査チップ。
【請求項１６】
前記複数のナノロッドの周期は、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲である、請求項１３～１５のいずれかに記載の検査チップ。
【請求項１７】
前記複数のナノロッドの直径または一辺の長さは、１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲である、請求項１３～１６のいずれかに記載の検査チップ。

【請求項１８】
前記複数のナノロッドの高さは、１００ｎｍ以上２μｍ以下の範囲である、請求項１３～１７のいずれかに記載の検査チップ。
【請求項１９】
前記複数のナノロッドは、２以上の異なる直径を有する円柱、もしくは２以上の異なる一辺の長さを有する角柱であり、かつ／または、２以上の異なる周期で配列されている、請求項１３～１８のいずれかに記載の検査チップ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、蛍光検出用生体分子検査チップに関する。
【背景技術】
【０００２】
表面プラズモン共鳴（Ｓｕｒｆａｃｅ　Ｐｌａｓｍｏｎ　Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ：ＳＰＲ）を利用した生体分子の検出法がある（例えば、特許文献１を参照）。
【０００３】
表面プラズモン共鳴センサーは、金や銀などの金属薄膜表面に発生する表面プラズモン共鳴現象を検出するデバイスである。表面プラズモンとは、金属－誘電体界面に生じる電子の疎密波の一種であり、その波数は金属薄膜表面に接する数１００ｎｍまでの試料の厚さや光学特性（誘電率、屈折率）によって変化する。この変化を直接測定することは不可能なため、ＳＰＲセンサーではレーザー光を試料の反対面から当てエバネッセント波を発生させ、これが表面プラズモンと共鳴する時のレーザーの入射角度変化を測定することで表面の状態の変化を間接的に測定するのが一般的な方法となっている。特許文献１では、センサー表面を様々な特性や機能を有する高分子を用いて化学修飾することで、より多くの生体成分を検出できるセンサーデバイスを提供できることが示唆されている。具体的には、金属薄膜をセンサー基板として用い、デバイスとしてＳＰＲ装置を使用して、抗原－抗体反応を利用した免疫センサーを提供することができる、として、抗体イミュノグロブリンＧ０．１μｇ／ｍｌを最も低濃度での検出結果として開示している。しかし、疾患診断において５ｎｇ／ｍｌ程度が基準値に設定されることから、十分に高精度な方法を提供しているとは言えない。
【０００４】
医療診断や検査に使用される方法として、エライザ法がある。これは対象の生体分子に酵素反応を導入することで、試料の吸光度から標的分子の濃度を検定する方法である。高精度な方法として、現在標準手法として確立されている。標的分子によっても異なるが、多くの抗体と共通の２重鎖、２軽鎖構造をもつ典型的な抗体であるイミュノグロブリンＧ（ＩｇＧ）では１５ｎｇ／ｍｌ程度に対して検出を保証している。早期がん診断などでは、１ｎｇ／ｍｌより高精度な生体分子検定法が必要とされているが、今日までその要請に十分応えられる方法は現れていない。
【０００５】
また、生体分子の検出において蛍光検出法が知られている（例えば、特許文献２および３を参照）。蛍光検出法は、励起光により励起されて蛍光を発する標的物質または蛍光標識された標的物質に、励起光を照射し、蛍光を検出することによって、標的物質を検出する方法である。
【０００６】
特許文献２によれば、反応チャンバと、インレット及びアウトレットと、前記反応チャンバと前記インレット及び前記アウトレットをそれぞれ接続する供給流路及び排出流路と、を有するマイクロ流路チップにおいて、凹部を有する基板ホルダと、該基板ホルダの凹部に装着された反応基板と、該基板ホルダ及び前記反応基板を覆うように配置された第１のシートと、該第１のシートを覆うように配置された第２のシートと、を有し、前記第１のシートは貫通孔を有し、該貫通孔によって、前記第２のシートと前記反応基板の間に前

記反応チャンバが形成され、前記反応基板は、前記反応チャンバに露出している第１の面と、前記基板ホルダの凹部に設けられた観察窓を介して外部に露出している第２の面と、を有し、前記反応基板の第１の面には局在型表面プラズモンが発生する微細構造からなる反応スポットが形成されていることを特徴とするマイクロ流路チップが開示される。

【０００７】

特許文献２の反応スポットには、蛍光標識された単一のプライマー分子が結合し、蛍光標識されたｄＮＴＰ分子が取り込まれる。これらの蛍光色素が、プリズムによって生じるエバネッセント光を励起光として発光し、局在型表面プラズモンを利用して局部発光を観測する配置が開示されているが、検出の効果（検出限界、検出感度など）については一切開示されていない。

【０００８】

一方、特許文献３の従来技術によれば、ミラーによって挟まれて構成されるレーザキャビティ領域に導入された対象物質に励起光を照射し、励起された蛍光をレーザキャビティの厚さ方向で共振させて、光強度を高めるバイオチップモジュールが開示される。しかしながら、このようなレーザキャビティの共振を利用しても十分な蛍光強度が得られていなかった。

【０００９】

最近、機能性を発現する人工ナノ構造表面（メタ表面とも呼ぶ）の研究が世界中で行われており、そのなかに、特に蛍光増強性能に優れたメタ表面がある（例えば、特許文献４および非特許文献１～３を参照）。特許文献４および非特許文献３は、基材と、前記基材の表面に位置するスラブ材と、少なくとも前記スラブ材上に位置する金属材料とを含み、被験物質の光学応答を増強させる表面増強ラマン分析用基板を開示する。前記基材は、少なくとも前記スラブ材と接する表面層を備え、前記スラブ材は、前記表面層の屈折率よりも高い屈折率を有する材料からなり、前記スラブ材の表面から前記基材の前記表面層に達する、周期的に配列した複数の穴を有し、前記金属材料は、前記スラブ材の表面、および、前記複数の穴のそれぞれを介した前記基材の表面層上に位置し、相補的な金属構造を有し、前記複数の穴の直径および周期によって決定される複数の共鳴を有する。

【００１０】

また、非特許文献１は、ＳＯＩ（Ｓｉｌｉｃｏｎ　ｏｎ　Ｉｎｓｕｌａｔｏｒ）基板に、電子ビームリソグラフィ（ＥＢＬ）およびボッシュ（ＢＯＳＣＨ）プロセスによりシリコンからなる複数のナノロッドを形成し、この基板が顕著な蛍光増強性能を有することを開示する。また、非特許文献１によれば、このような複数のナノロッドを作製した基板の生体分子の蛍光検出法への適用が示唆される。

【００１１】

非特許文献２は、特許文献１に示す相補的な金属構造上に自己組織化単分子膜（ＳＡＭ）を付与することにより、ローダミン色素の蛍光信号がＳＡＭなしの場合と比して、さらに数十倍増大することを報告する。

【００１２】

しかしながら、特許文献４や非特許文献１～３に示されるメタ表面を蛍光検出法に適用する場合において、メタ表面単体では液体中の生体分子がメタ表面に効率的に固定されず、疾患診断などに求められる高精度な蛍光検出法を提供することはできない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１３】

【文献】特許第３６５７７９０号公報
特開２０１１－２２０９９６号公報
特開２００６－１７７８７８号公報
特開２０１７－１７３０８４号公報

【非特許文献】

【００１４】

【文献】Ｍａｓａｎｏｂｕ　Ｉｗａｎａｇａ，Ａｐｐｌ．Ｓｃｉ．，２０１８，８，１３２８
Ｂｏｎｇｓｅｏｋ　Ｃｈｏｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．２０１５，５１，１１４７０－１１４７３
Ｍａｓａｎｏｂｕ　Ｉｗａｎａｇａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｎｏｓｃａｌｅ，２０１６，８，１１０９９－１１１０７
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１５】
以上から、本発明の課題は、蛍光検出法による生体分子の検出のためのメタ表面を用いた検査チップを提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００１６】
本発明による蛍光検出用生体分子検査チップは、メタ表面を有する第１の基板と、前記第１の基板と対向して位置し、マイクロ流路を有する第２の基板とを備え、前記メタ表面は、検出されるべき生体分子の固定を効率化する間隙を有すると共に、前記生体分子が発する蛍光の波長範囲を含む領域において蛍光増強を示し、前記第２の基板は、可視光または近赤外光を透過する材料からなり、前記第１の基板と前記第２の基板との間で前記蛍光が共振し、これにより上記課題を解決する。
前記メタ表面は、金属の相補的積層構造またはナノロッド構造であってもよい。
前記蛍光増強は、可視光領域または近赤外光領域における波長を有する光の強度の増強であってもよい。
前記第１の基板と前記第２の基板とにより形成されるマイクロ流路の高さは、１０μｍ以上１００μｍ以下の範囲であってもよい。
前記第１の基板と前記第２の基板とにより形成されるマイクロ流路の高さは、１５μｍ以上５０μｍ以下の範囲であってもよい。
前記メタ表面は、前記金属の相補的積層構造であり、前記金属の相補的積層構造は、基材と、前記基材の表面に位置するスラブ材と、少なくとも前記スラブ材上に位置する金属材料とを含み、前記基材は、少なくとも前記スラブ材と接する表面層を備え、前記スラブ材は、前記表面層の屈折率よりも高い屈折率を有する材料からなると共に、その表面から前記基材の前記表面層に達する、周期的に配列した複数の穴を有し、前記金属材料は、前記スラブ材の表面、および、前記複数の穴の底面を形成する前記基材の表面層上にそれぞれ位置し、これにより上記課題を解決する。
前記金属材料は、ドルーデ金属に近似できる複素誘電率を有する物質であってもよい。
前記ドルーデ金属に近似できる複素誘電率を有する物質は、金（Ａｕ）、銀（Ａｇ）、銅（Ｃｕ）、アルミニウム（Ａｌ）、白金（Ｐｔ）、チタン（Ｔｉ）、ニッケル（Ｎｉ）、および、これらの合金からなる群から選択されてもよい。
前記複数の穴は、２以上の異なる直径を有する円孔、もしくは２以上の異なる一辺の長さを有する角柱状孔であり、かつ／または、２以上の異なる周期で配列されていてもよい。
前記複数の穴の周期は、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲であってもよい。
前記複数の穴の直径または一辺の長さは、１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲であってもよい。
前記スラブ材の厚さは、１００ｎｍ以上２μｍ以下の範囲であってもよい。
前記メタ表面は、前記ナノロッド構造であり、前記ナノロッド構造は、基材と、前記基材の表面に周期的に起立する複数のナノロッドとを備え、前記基材は、前記複数のナノロッドの屈折率よりも小さい屈折率を有する材料からなってもよい。
前記基材は、１以上１．６以下の屈折率を有する材料からなり、前記複数のナノロッドは、２以上５以下の屈折率を有する半導体または誘電体からなってもよい。
前記半導体または誘導体は、シリコン、ゲルマニウム、窒化ガリウム、および、二酸化チタンからなる群から選択されてもよい。

前記複数のナノロッドの周期は、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲であってもよい。
前記複数のナノロッドの直径または一辺の長さは、１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲であってもよい。
前記複数のナノロッドの高さは、１００ｎｍ以上２μｍ以下の範囲であってもよい。
前記複数のナノロッドは、２以上の異なる直径を有する円柱、もしくは２以上の異なる一辺の長さを有する角柱であり、かつ／または、２以上の異なる周期で配列されていてもよい。
【発明の効果】
【００１７】
本発明の蛍光検出用生体分子検査チップによれば、生体分子の捕捉および固定を効率化する間隙を有し、なおかつ顕著な蛍光増強特性を有する第１の基板を、マイクロ流路を備えた第２の基板と対向配置させることにより、液体試料中の生体分子であっても蛍光検出を可能にする。本発明の検査チップにおいては、第１の基板および第２の基板と、それらの間のマイクロメートルオーダの空間とがマイクロ共振器を構成し、生体分子から生じる蛍光が共振する。その際に、第１の基板のメタ表面は、蛍光を増強すると同時に、第２の基板側に効率的に放射することから、マイクロ共振器から蛍光放射は一方向に集約され、蛍光検出される効率を高める。これにより、より低濃度の生体分子であっても、高感度かつ再現性よく蛍光検出することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１８】
【図１】本発明の蛍光検出用生体分子検査チップを示す模式図
【図２】本発明の蛍光検出用生体分子検査チップを用いた検出原理を示す模式図
【図３】金属の相補的積層構造を有するメタ表面の模式図
【図４】ナノロッド構造を有するメタ表面の模式図
【図５】本発明による検査チップを用いた検出装置を示す模式図
【図６】本発明の蛍光検出用生体分子検査チップを用いて試料溶液中に標的生体分子が存在するか否かを判定するフロー図
【図７】シリコンナノロッド構造のメタ表面を示すＳＥＭ像
【図８】金の相補的積層構造であるメタ表面を示すＳＥＭ像
【図９】実施例１の検査チップの外観（Ａ）、およびこれを配置した流路装置の外観（Ｂ）を示す図
【図１０】実施例３の検査チップの外観を示す図
【図１１】検査後の実施例１の検査チップの様子を示す図
【図１２】実施例１の検査チップを用いた発光スペクトルを示す図
【図１３】比較例１の検査チップを用いた発光スペクトルを示す図
【図１４】実施例１による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図１５】実施例２による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図１６】実施例３による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図１７】実施例４による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図１８】実施例５による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図１９】比較例１による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図２０】比較例２による蛍光測定から得た標準曲線を示す図
【図２１】実施例６による捕捉抗体の有無による蛍光強度の比較を示す図
【図２２】実施例８による検査チップの蛍光像
【図２３】実施例９による種々のバッファーによる蛍光強度の比較を示す図
【図２４】実施例１０による各チャネルの蛍光像および生体分子固定状態を示す模式図
【図２５】実施例１０による蛍光強度の比較を示す図
【図２６】実施例１１による検査チップのメタ表面の上の分子の様子を示す模式図
【図２７】実施例１１による種々の濃度のＣＥＡの蛍光像を示す図

【図２８】実施例１１による蛍光測定から得たＣＥＡの蛍光強度の濃度依存性を示す図
【発明を実施するための形態】
【００１９】
以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態を説明する。なお、同様の要素には同様の番号を付し、その説明を省略する。
【００２０】
本発明の蛍光検出用生体分子検査チップについて説明する。
【００２１】
図１は、本発明の蛍光検出用生体分子検査チップを示す模式図である。
図２は、本発明の蛍光検出用生体分子検査チップを用いた検出原理を示す模式図である。
【００２２】
本発明の蛍光検出用生体分子検査チップ１００は、メタ表面１１０を有する第１の基板１２０と、そのメタ表面１１０側に対向して位置し、マイクロ流路１３０を有する第２の基板１４０とを備える。メタ表面１１０は、検出されるべき生体分子（以降では簡単のため標的生体分子と称する）の固定を効率化する間隙を有し、かつ、蛍光増強を示す。
【００２３】
ここで、「標的生体分子」とは、疾患診断のマーカー分子として使用される抗体や抗原、プロコラーゲンＩＩＩペプチド、副次生成タンパク質等の生体分子であるが、例示的には、肝炎ウイルスＩｇＭ型抗体、肝炎ウイルスｓ抗原、ＣＥＡ分子、ｐ５３分子、ｐ５３抗体等の生体分子、ＲＮＡ、ＤＮＡなどの核酸およびその細分化された分子等である。
【００２４】
「間隙を有するメタ表面」とは、生体分子よりも大きい数十～数百ナノメートルオーダの間隙を有する立体構造からなる表面を意図する。このような間隙を有することにより、メタ表面１１０の表面積が大きくなり、生体分子の固定を効率化できる。また、流体の速度を局所的に低減させることで生体分子の固定を効率化できる。図１では巨視的に示すため、また図２では分子を拡大模式化して示すため、いずれも間隙は図示しないが、メタ表面１１０は間隙を有している。そして、図２には、メタ表面１１０上に捕捉分子が固定され、その捕捉分子に捕捉抗体が結合し、さらに、捕捉抗体に効率的に蛍光標識付き生体分子が結合している様子が示される。このように、メタ表面１１０は、生体分子の固定を効率化し得る。後述する図３の３５０、図４の４３０が間隙にあたる。
【００２５】
「蛍光増強を示すメタ表面」とは、上述したように、人工ナノ表面構造であって、その上に蛍光を発する物質が位置する場合に、シリコンウェーハや高平滑な石英基板などの平坦な表面上に位置する場合に比して、蛍光強度が増大するものを意図する。本発明の検査チップ１００によれば、第１の基板１２０のメタ表面１１０は、さらに、標的生体分子（例えば、図２の蛍光標識付き生体分子）が発する蛍光の波長範囲を含む領域において蛍光増強を示すため、標的生体分子の濃度が低濃度であっても、その濃度を高精度に検出することができる。なお、「標的生体分子が発する蛍光」とは、標的生体分子それ自身が発する蛍光、標的生体分子に標識化された蛍光標識が発する蛍光、あるいは、標的生体分子に捕捉された二次抗体に標識化された蛍光標識が発する蛍光を意図する。
【００２６】
本発明の検査チップ１００における第２の基板１４０は、可視光または近赤外光を透過する材料（光透過性材料）からなる。第１の基板１２０上に位置する標的生体分子に光（励起光）が照射されると、標的生体分子あるいは標識化された蛍光標識が励起され、蛍光を発する。この標的生体分子が発する蛍光は、図２に示すように、第１の基板１２０と第２の基板１４０との間で共振する。この結果、標的生体分子からの蛍光の強度が増大され、標的生体分子の濃度が低濃度であっても、その濃度を高精度に検出することができる。さらに、共振によって増大した蛍光は、メタ表面１１０ではなく、第２の基板１４０側に放射されるので、第２の基板１４０が光透過性材料からなると、蛍光は第２の基板１４０を透過し、効率良く検出される。本願明細書において、可視光とは、波長３６０ｎｍ以上

８３０ｎｍ未満の範囲の波長を有する光を意図する。また、近赤外光とは波長８３０ｎｍ以上１６００ｎｍ以下の範囲の波長を有する光を意図する。

【００２７】

なお、本願明細書において、可視光または近赤外光を透過する材料とは、可視光または近赤外光の平均透過率が６０％以上となる材料を意味する。前記平均透過率は、好ましくは８０％以上である。このような可視光または近赤外光を透過する材料は、透明セラミクス、ガラス等の無機材料およびプラスチック等の有機材料を使用できるが、加工性の観点から、シリコーン系樹脂、（メタ）アクリル系樹脂、エポキシ系樹脂、スチレン系樹脂、ポリカーボネート、エステル系樹脂、アクリロニトリル－ブタジエン－スチレン樹脂、ポリアミド、シクロオレフィンポリマー等が好ましい。中でも、シリコーン系樹脂であるポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）が好ましい。

【００２８】

メタ表面１１０の示す蛍光増強は、可視光域または近赤外光域における波長を有する光の強度の増強であり、好ましくは、５２０ｎｍ以上１５００ｎｍ以下の波長範囲にピークを有する光の増強である。これにより、生体分子の検出精度が向上する。さらに好ましくは、５４０ｎｍ以上６２０ｎｍ以下または８００ｎｍ以上９００ｎｍ以下の波長範囲にピークを有する光を増強する。

【００２９】

第１の基板１２０と第２の基板１４０とにより形成されるマイクロ流路の高さ、すなわち第１の基板１２０と、第２の基板１４０のマイクロ流路との間の距離Ｄ（図２）は、好ましくは、１０μｍ以上１００μｍ以下の範囲である。この範囲であれば、マイクロ共振器としての機能が顕在化すると共に、マイクロ流路として標的生体分子を第１基板１２０上へ固定する効率が高まる。一方で、距離Ｄを１０μｍよりも小さくする場合、流路内での安定的な液流が困難となる、または第２基板１４０が自重により変形した際に、第１基板１２０に接触するなどの不具合が起こることが予見され、好ましくない。距離Ｄは、より好ましくは、１５μｍ以上５０μｍ以下の範囲である。

【００３０】

メタ表面１１０は、好ましくは、金属の相補的積層構造またはナノロッド構造である。これらの構造は、生体分子の固定を効率化する間隙を有し、かつ、蛍光増強を示し得る。

【００３１】

図３は、金属の相補的積層構造を有するメタ表面の模式図である。

【００３２】

金属の相補的積層構造を有するメタ表面３００は、基材３１０と、基材３１０の表面に位置するスラブ材３２０と、スラブ材３２０および基材３１０の表面層３４０上に位置する金属材料３３０とを含む。

【００３３】

基材３１０は、少なくともスラブ材３２０と接する表面層３４０を備える。スラブ材３２０は、表面層３４０の屈折率よりも高い屈折率を有する材料からなる。さらに、スラブ材３２０は、スラブ材３２０の表面から基材３１０の表面層３４０に達する周期的に配列した複数の穴３５０を有する。このような構造により、基材３１０およびスラブ材３２０は、六方格子状、正方格子状等の周期的に配列される複数の穴３５０の周期Λ_1および直径D_1によって決定される周期構造体に特徴的な光の共鳴バンド状態を有する。この場合に、スラブ材３２０の屈折率が、表面層３４０の屈折率よりも大きいことが、スラブ材３２０への光のバンド状態密度（閉じ込め効果）を大きくするために必要である。

【００３４】

金属材料３３０は、スラブ材３２０の表面、および複数の穴３５０の底面を形成する基材３１０の表面層３４０上にそれぞれ位置しており、これにより相補的な金属積層構造を形成している。換言すれば、金属材料３３０は、スラブ材３２０の複数の穴３５０における穴側壁３６０を覆わず、金属材料３３０同士がスラブ材３２０の厚さから金属材料３３０の厚さを引いた距離だけ離間することを典型とする。以上のような構造により、金属の

相補的積層構造を有するメタ表面３００は、標的生体分子の発する蛍光が金属材料３３０で覆われていない穴側壁３６０を通ってスラブ材３２０内に閉じ込められる共鳴状態を形成できる。さらに、金属材料３３０が付与されていることで、前述した共鳴の線幅がそれぞれ広帯域化される。これにより、この複数の共鳴の少なくとも１つが、標的生体分子からの蛍光波長と重なり、その共鳴の線幅の範囲において効率的に蛍光が増強される。

【００３５】

スラブ材３２０は、屈折率が２以上の材料からなることが好ましい。これは、表面層３４０に屈折率が１．５程度の材料が多く使用されることによる。スラブ材３２０の屈折率の上限は特に制限されないが、入手できる材料から概ね５以下となる。スラブ材３２０を構成する材料の具体例としては、Ｓｉ、Ｇｅ、ＳｉＮ、ＳｉＣ、ＩＩ－ＶＩ属の半導体、ＩＩＩ－Ｖ属の半導体および二酸化チタン（TiO_2）からなる群から選択されるものが挙げられる。これらの材料であれば、屈折率が２以上であり、加工性に優れるまたは成長技術が発展しているため、容易にスラブ材３２０を形成できる。

【００３６】

スラブ材３２０は、好ましくは、１００ｎｍ以上２μｍ以下の範囲の厚さを有する。この範囲であれば、光のバンド状態が形成されやすくなる。そして、この厚さ範囲にあるスラブ材３２０に金属材料３３０が組み合わされて相補的な積層構造を形成することにより、光の放射率の大きな共鳴状態が発現し、標的生体分子の発する蛍光を放射する効率を高める。より好ましくは、スラブ材３２０は、１５０ｎｍ以上２５０ｎｍ以下の範囲の厚さを有し、これにより、スラブ材３２０への光の閉じ込め効果が増し、金属材料３３０との組み合わせた相補的な積層構造において、蛍光増強に適した共鳴状態を構成しやすくなる（例えば、非特許文献２、３）。

【００３７】

複数の穴３５０の周期Λ_1は、光の波長程度であるが、好ましくは、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲である。この範囲であれば、メタ表面３００は、５２０ｎｍ以上１５００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。周期Λ_1は、より好ましくは、４００ｎｍ以上７５０ｎｍ以下の範囲である。これにより、メタ表面３００は、５４０ｎｍ以上９００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。複数の穴３５０は、２以上の異なる周期を有する穴であってもよい。この場合も、２以上の異なる周期のそれぞれが、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲であれば、可視光域および近赤外光域において複数の波長範囲の光を増強できるので、蛍光標識の異なる２種以上の生体分子の検出も可能となる。

【００３８】

複数の穴３５０の直径D_1は、周期Λ_1よりも小さく、かつ１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲であれば、メタ表面３００により、５４０ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。直径D_1は、より好ましくは、２５０ｎｍ以上３５０ｎｍ以下の範囲である。この範囲にあれば、メタ表面３００により、５４０ｎｍ以上９００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。

【００３９】

なお、複数の穴３５０は、２以上の異なる直径を有する穴であってもよい。この場合も、２以上の異なる直径のそれぞれが、１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲であれば、可視光域および近赤外光域において複数の波長範囲の光を増強できるので、蛍光標識の異なる２種以上の生体分子の検出も可能となる。

【００４０】

当然ながら、複数の穴３５０が、２以上の異なる直径で形成され、かつ２以上の異なる周期で配列されていてもよく、これにより、蛍光増強可能な可視光および近赤外光の波長域を制御でき、多様な生体分子に対応できる。

【００４１】

穴の形状は、図３では円柱状（円孔）を意図しているが、これに限らず、三角柱状、四角柱状を始めとする角柱状などその他の形状であってもよく、共鳴状態を呈する限り、制限はない。

【００４２】
基材３１０の表面層３４０は、好ましくは、屈折率が２未満の材料からなる。表面層３４０の屈折率の下限は特に限定されないが、入手できる材料から概ね１以上となる。表面層３４０には、いわゆる透明絶縁体を採用でき、具体例としては、SiO_2、Al_2O_3、ガラスおよびプラスチックからなる群から選択される材料が挙げられる。プラスチックには、第２の基板１４０の材料として例示した樹脂が含まれる。これらの材料であれば、上述のスラブ材３２０との屈折率の大小関係により、効率的に、スラブ材３２０に光を閉じ込めることができる。なお、基材３１０は、Ｓｉ基板、石英基板などのバルク基板と表面層３４０とから形成され、バルク基板は、スラブ材３２０および金属材料３３０を保持できる任意の基板であり得る。容易に入手でき、加工性に優れるメタ表面の材質としては、基材３１０をＳｉ基板として、表面層３４０をSiO_2とし、Ｓｉからなるスラブ材３２０と融着したものが挙げられる。また、基材３１０をガラス基板などとし、Ｓｉ層を成膜形成してスラブ材３２０とすることも可能である。
【００４３】
表面層３４０の厚さは、スラブ材３２０の厚さと同じまたはそれ以上であることが好ましい。これにより、スラブ材３２０を光損失の少ない導波路とすることができる。表面層３４０は、より好ましくは、２００ｎｍ以上の厚さを有する。
【００４４】
金属材料３３０は、特に制限はないが、ドルーデ金属に近似できる複素誘電率を有するものが好ましい。ドルーデ金属とは、自由電子を有する金属をモデル化したものであり、複素誘電率$\varepsilon(\omega)=1-\omega_p^2/\omega(\omega+i\gamma)$で表される金属である。ここで、ωは角周波数、$\omega_p$はプラズマ周波数、ｉは虚数単位、γはダンピング定数である。一般的に、多くの金属が、電子のバンド間遷移が生じる波長近傍を除いて、ドルーデ金属として近似できることが知られている（例えば、Ｆｒｅｄｅｒｉｃｈ Ｗｏｏｔｅｎ，Ｏｐｔｉｃａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ Ｓｏｌｉｄｓ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９７２，第５２頁～第６５頁）。なお、本願明細書では、ω_pとγをフィッティングパラメータとして、実測された複素誘電率$\varepsilon(\omega)$を、各ωに対して２０％以下のずれで前述の式にフィッティングできる場合に、対象の金属材料３３０をドルーデ金属に近似できるとする。
【００４５】
可視光域あるいは近赤外光域において、このようなドルーデ金属に近似できる複素誘電率を有する物質としては、金（Ａｕ）、銀（Ａｇ）、銅（Ｃｕ）、アルミニウム（Ａｌ）、白金（Ｐｔ）、チタン（Ｔｉ）、ニッケル（Ｎｉ）およびそれらの合金からなる群から選択される物質が例示される。金属材料３３０は、好ましくは、３０ｎｍ以上１００ｎｍ以下の範囲の厚さを有する。厚さが３０ｎｍ未満であると、光が透過してしまい、金属として機能しない場合があり得る。厚さが１００ｎｍを超えると、穴３５０の側壁がふさがれてしまい、相補的な金属積層構造を形成できない場合があり得る。より好ましくは、金属材料３３０は、３０ｎｍ以上４０ｎｍ以下の範囲の厚さを有する。
【００４６】
図４は、ナノロッド構造を有するメタ表面の模式図である。
【００４７】
ナノロッド構造を有するメタ表面４００は、基材４１０の表面に周期的に起立する複数のナノロッド４２０を備える。ここで、基材４１０はナノロッド４２０の材料よりも小さい屈折率をもつ材料からなることが好ましい。
【００４８】
基材４１０が検査チップ１００に入射される光の波長域において透明で、屈折率が１以上１．６以下の材料からなる場合、ナノロッド４２０の材料としては、屈折率が２以上５以下である半導体または誘電体が好ましい。なぜなら、ナノロッドの材料が大きな屈折率をもつほど、ナノロッドは明瞭な共鳴状態を有するためである。この明瞭な共鳴状態は、蛍光増強効果などの共鳴増強効果を生じるために必要な物理条件であり、反射または透過

スペクトルによって容易に確認できる。他方、基材４１０の屈折率がナノロッド４２０の材料と同程度以上の屈折率を有する場合、共鳴状態は不明瞭となり、顕著な共鳴増強効果は期待できない。

【００４９】

例えば、検査チップ１００に入射する光の波長が５００ｎｍ以上１１００ｎｍ以下の範囲である場合、ナノロッド４２０の材料は、シリコン、ゲルマニウム、窒化ガリウム、および、二酸化チタンからなる群から選択される。これらの材料は、２以上５以下の屈折率を有する。

【００５０】

複数のナノロッド４２０の周期Λ_2は、光の波長程度であるが、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲であると、メタ表面４００が、５２０ｎｍ以上１５００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。周期Λ_2は、より好ましくは、３００ｎｍ以上４５０ｎｍ以下の範囲を有する。これにより、メタ表面４００が、５４０ｎｍ以上９００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。複数のナノロッド４２０は、２以上の異なる周期を有するナノロッドであってもよい。この場合も、上述した金属の相補的積層構造と同様に、２以上の異なる周期のそれぞれが、３００ｎｍ以上１０００ｎｍ以下の範囲であると、可視光域および近赤外光域において複数の波長範囲の光を増強できるので、蛍光標識の異なる２種以上の生体分子の検出も可能となる。

【００５１】

複数のナノロッド４２０の直径D_2は、前述の周期Λ_2より小さく、かつ１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲であると、該周期Λ_2が好ましい範囲にある場合と同様に、メタ表面４００が、５２０ｎｍ以上１５００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。直径D_2は、より好ましくは、２００ｎｍ以上３５０ｎｍ以下の範囲である。これにより、メタ表面４００が、５４０ｎｍ以上９００ｎｍ以下の波長範囲の光を増強できる。

【００５２】

なお、複数のナノロッド４２０は、２以上の異なる直径を有するナノロッドであってもよい。この場合も、２以上の異なる直径のそれぞれが、１００ｎｍ以上５００ｎｍ以下の範囲であると、可視光域および近赤外光域において複数の波長範囲の光を増強できるので、蛍光標識の異なる２種以上の生体分子の検出も可能となる。

【００５３】

当然ながら、複数のナノロッド４２０が、２以上の異なる周期および２以上の異なる直径で配列されていてもよく、これにより、蛍光増強可能な光の波長域を高精度に制御でき、多様な生体分子に対応できる。

【００５４】

複数のナノロッド４２０の高さは、好ましくは、１００ｎｍ以上２μｍ以下の範囲である。この範囲であれば、ナノロッドに局在する電磁波共鳴の効果が顕著となり、明瞭な共鳴状態を生じることができる。より好ましくは、複数のナノロッド４２０は、１５０ｎｍ以上２５０ｎｍ以下の範囲の高さを有し、これにより、低次の共鳴状態の利用が可能になり、大きな蛍光増強が期待できる。

【００５５】

ナノロッドの形状は、図４では円柱状を意図しているが、これに限らず、三角柱状、四角柱状を始めとする角柱状などその他の形状であってもよく、共鳴状態を呈する限り、制限はない。

【００５６】

図５は、本発明による検査チップを用いた検出装置を示す模式図である。

【００５７】

検出装置５００は、少なくとも、検査チップ１００に励起光を照射する光源５１０と、検査チップ１００から放射される蛍光を検出する検出手段５２０とを備える。

【００５８】

光源５１０としては、キセノンランプ、発光ダイオード、レーザダイオード、半導体レ

ーザおよび有機ＥＬ発光体等が採用できる。光源５１０からの励起光が、所期の波長および角度で検査チップ１００に入射し、図１に示す第２の基板１４０を透過してメタ表面１１０を照射するよう、検出装置５００は、波長選択フィルタ、ミラー、ビームスプリッタ等の光学系をさらに備えてもよい。

【００５９】

検出手段５２０は、励起光によって励起された蛍光を検出可能なものであれば任意の検出手段を採用できるが、例示的には、光検出器、ＣＣＤカメラ、ＣＭＯＳカメラ、フォトダイオードアレイ、分光計等である。また、検出装置５００は、対物レンズ、結像レンズ等の光学系をさらに備えてもよい。

【００６０】

検出装置５００は、さらに、励起光と蛍光とを分離するフィルタ５３０を備えてもよい。これにより、迷光を抑制し、バックグランドの低い高精度な光測定ができる。

【００６１】

また、検出装置５００は、検出手段５２０からのデータを入手し、解析するコンピュータ５４０を備えてもよい。コンピュータ５４０は、入手したデータに基づいて信号、バックグラウンド等の解析を行ってもよい。例えば、コンピュータ５４０が蛍光強度と濃度との関係、蛍光標識とその発光ピークとの関係、および蛍光標識と各種生体分子との関係等のデータを格納したメモリを備える場合、入手したデータから検出された生体分子の種類を特定したり、特定された生体分子の濃度を算出したりできる。また、コンピュータ５４０が解析したデータをディスプレイやプリンタ等の出力装置５５０に出力し、表示するようにしてもよい。

【００６２】

また、検出装置５００は、１以上の試料溶液、捕捉分子、捕捉抗体等の試薬、洗浄液等をそれぞれ保持する供給容器、および測定後の廃液を保持する回収容器を備えてもよく、これらの容器に接続された分注機構（図示せず）をさらに備えてもよい。分注機構の動作は、コンピュータ５４０によって制御されてもよい。これにより、自動検出・解析を可能とする。

【００６３】

図６は、本発明の蛍光検出用生体分子検査チップを用いて試料溶液中に標的生体分子が存在するか否かを判定するフロー図である。

【００６４】

図５の検出装置５００を用い、標的生体分子の存在の有無を判定するものとして説明する。ステップごとに詳述する。

ステップＳ６１０：標的生体分子を捕捉するための捕捉分子を含有する溶液を、図１に示す検査チップ１００のマイクロ流路１３０に流し、メタ表面１１０に固定する。メタ表面１１０は間隙を有するため、捕捉分子を含有する溶液をマイクロ流路１３０に流すだけで、捕捉分子は容易に固定される。このような捕捉分子は、標的生体分子に応じて適宜選択される。捕捉分子を含有する溶液を流す前に、流路内を液体で満たすためにリン酸生理食塩水（ＰＢＳ）などのバッファーなどを流してもよい。

【００６５】

例えば、標的生体分子が、免疫グロブリンなどのタンパク質である場合には、ＦＣ結合によってタンパク質を捕捉し得る任意の捕捉分子を使用できる。このような捕捉分子としては、代表的には、抗体結合タンパク質またはアビジン誘導体が挙げられる。

【００６６】

抗体結合タンパク質は、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＡＧ、および、これらの誘導体からなる群から選択される。アビジン誘導体は、ビオチンと結合能を有するものであれば特に制限はないが、好ましくは、ストレプトアビジン、アビジン、ニュートラアビジン、および、これらの誘導体からなる群から選択される。

【００６７】

標的生体分子は、タンパク質以外にもＲＮＡやＤＮＡなどの核酸であってもよい。この

場合、ハイブリダイゼーションによって核酸を特異的に捕捉する相補的なＤＮＡを捕捉分子（通例、アプタマーと呼ばれる）として使用できる。

【００６８】

ステップＳ６１０において、捕捉分子のメタ表面１１０への固定を促進するため、ＥＤＣ（１－ｅｔｈｙｌ－３－（３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ）－ｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ）／ＮＨＳ（Ｎ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ）などの試薬を用いて、捕捉分子の結合末端を活性化してもよい。捕捉分子を含む溶液を流した後、バッファーなどを流し、浮遊分子の除去と流路内の洗浄を行う。なお、マイクロ流路を通した捕捉分子を含有する溶液は廃液用の回収容器（図示せず）に回収してもよい。

【００６９】

ステップＳ６２０：被験生体分子を含有する溶液を検査チップ１００のマイクロ流路１３０に流す。これにより、被験生体分子中に標的生体分子が存在する場合、標的生体分子は、ステップＳ６１０でメタ表面１１０に固定された捕捉分子によって特異的に捕捉され、メタ表面１１０に固定される。標的生体分子が、前述した免疫グロブリンなどのタンパク質であり、捕捉分子が、前述の抗体結合タンパク質またはアビジン誘導体である場合、標的生体分子は、マイクロ流路１３０を流れる間に捕捉される。ここでも、マイクロ流路を通した被験生体分子を含有する溶液は廃液用の回収容器に回収してもよい。

【００７０】

標的生体分子そのものが、後述する励起光によって励起され蛍光を発する、あるいは、標的生体分子が、後述する励起光によって励起され蛍光を発する蛍光標識で標識化されている場合、ステップＳ６３０に進む。ここでも、ステップ６３０に進む前に、マイクロ流路にバッファーなどで流して浮遊分子や非特異吸着分子を除去することが好ましい。

【００７１】

一方、標的生体分子そのものが、蛍光を発せず、かつ、蛍光標識で標識化されていない場合には、ステップＳ６２０に続いて、蛍光標識化されたさらなる抗体分子（二次抗体とも呼ぶ）を含有する溶液を検査チップ１００のマイクロ流路１３０に流せばよい。このような二次抗体は、交差特性から標的生体分子に特異的に結合する性質の抗体分子であり、標的生体分子自体の蛍光標識の代用として採用することができる。また、二次抗体同士も結合する性質があり、蛍光の増幅に役立つことが期待される。

【００７２】

なお、標的生体分子、または、二次抗体を標識化する蛍光標識には、周知のものが採用されるが、例示的には、ＤｙＬｉｇｈｔ、フルオレセイン、アクリロダン、ローダミン、ＢＯＤＩＰＹ、アクリジンオレンジ、エオシン、ピレン、アクリジンオレンジ、ＰｙＭＰＯ、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５３２、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５４６、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５６８、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５５５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６３３、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６６０、および、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６８０からなる群より選択される。これらの蛍光標識は、励起波長および蛍光波長が既知である。

【００７３】

標的生体分子、あるいは、二次抗体の標識化は、市販の蛍光標識キットに記載の公知方法によって行うことができる。

【００７４】

ステップＳ６３０：励起光を、検査チップ１００の第２の基板１４０側から入射し、メタ表面１１０に照射する。このような励起光は、図５の検出装置５００の光源５１０から発せられる。メタ表面１１０に標的生体分子が存在すれば、励起光の照射によって、標的生体分子それ自身に基づいて、または、標的生体分子に標識化された蛍光標識、もしくは標的生体分子に結合した二次抗体に標識化された蛍光標識に基づいて、蛍光が発せられる。このように、本発明では、例えば、特許文献２のようにプリズムを配置してエバネッセ

ント光で標的生体分子を励起する必要はない。

【００７５】

蛍光が発せられると、図２に示すように、検査チップ１００の第１の基板１２０と第２の基板１４０との間で蛍光が共振し、第２の基板１４０側に放射される。

【００７６】

ステップＳ６４０：第２の基板１４０側から放射された光を検出する。このステップでは、図５の検出装置５００の検出手段５２０を用いて、放射された蛍光を検出する。

【００７７】

ステップＳ６５０：検出された蛍光に基づいて、被験生体分子中に標的生体分子が存在するか否かを判定する。検出された光が、前述の蛍光標識に基づく蛍光、あるいは、標的生体分子自身による蛍光である場合には、標的生体分子が存在すると判定できる。検出された光が、上述の蛍光標識に基づく蛍光、あるいは、標的生体分子自身による蛍光でない場合には、標的生体分子が存在しないと判定できる。このような判定は、検出装置５００のコンピュータ５４０にて行ってもよいし、出力装置５５０に表示されたスペクトルあるいは光学画像から判定してもよい。

【００７８】

以上のステップで使用した検査チップ１００は、メタ表面１１０に固定された捕捉分子等を除去することにより、繰り返し使用できる。捕捉分子等のタンパク質の除去には、アルカリ水溶液を用い、超音波洗浄することが好ましい。

【００７９】

次に具体的な実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【００８０】

［メタ表面］

メタ表面として、シリコンナノロッド構造および金の相補的積層構造をそれぞれ作製した。

【００８１】

シリコンナノロッド構造からなるメタ表面を作製するために、絶縁体上のシリコン（ＳＯＩ：Ｓｉｌｉｃｏｎ　Ｏｎ　Ｉｎｓｕｌａｔｏｒ）層と埋め込み酸化膜（ＢＯＸ：Ｂｕｒｉｅｄ　Ｏｘｉｄｅ）層とを備えたＳｉ基板４１０（図４）を用意した。この基板は、全体としてＳＯＩ基板と呼ばれる。ＳＯＩ層の厚さは２００ｎｍ、ＢＯＸ層の厚さは３７５ｎｍであった。なお、ＳＯＩ層は、結晶性Ｓｉであり、ＢＯＸ層はSiO_2であった。

【００８２】

周期Λ_2が４００ｎｍ、直径D_2が３００ｎｍ、および、周期Λ_2が３００ｎｍ、直径D_2が２２０ｎｍの円柱周期配列をそれぞれ設計した。電子ビームリソグラフィ（ＥＢＬ）をＳＯＩ基板に行い、レジストマスクを作製した。ＢＯＳＣＨ加工による異方的かつ選択的エッチングを行い、ＳＯＩ層のみをエッチングした。その結果、周期Λ_2が４００ｎｍで、直径D_2が３０２ｎｍ、３１６ｎｍまたは３２０ｎｍである各種シリコンナノロッド構造が得られた。また、周期Λ_2が３００ｎｍで、直径D_2が２３６ｎｍのシリコンナノロッド構造も得られた。このようにして、ＳＯＩ層の厚さと同じ高さの複数のシリコンロッドを製造した。ＢＯＳＣＨ加工後、残ったマスクをO_2プラズマにより除去した。得られたシリコンナノロッド構造であるメタ表面を走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ、日立製作所製、型番ＳＵ８２３０）により観察した。結果を図１１（Ｂ）に示す。

【００８３】

金の相補的積層構造であるメタ表面は、埋め込み酸化膜３４０（図３）を備えたＳｉ基板３１０（図３）上に、Ｓｉのスラブ材３２０（図３）を有し、金属材料３３０として金（Ａｕ）を備えるものとした。スラブ材３２０に形成された穴は、直径D_1が３０２ｎｍ、２９１ｎｍ、２５０ｎｍ、または３１５ｎｍのいずれかで、深さが２３０ｎｍであり、一方向の周期Λ_1が４１０.５ｎｍで、これと直交する方向の周期が７１０ｎｍであった。

これらの周期は、周期的に配置された穴が形成する矩形単位胞の短辺と長辺の長さである。

【００８４】

金の相補的積層構造であるメタ表面は、特許文献４の実施例１と同様の手順で作製した。得られた金の相補的積層構造であるメタ表面をＳＥＭにより観察した。結果を図８に示す。

【００８５】

図７は、シリコンナノロッド構造のメタ表面を示すＳＥＭ像である。

図８は、金の相補的積層構造であるメタ表面を示すＳＥＭ像である。

【００８６】

図７には、高さが２００ｎｍで、高さ方向に垂直な断面が、一辺３２０ｎｍの正方形である四角柱状のシリコンナノロッドが、周期４００ｎｍで配列したナノロッド構造が示される。図８には、周期４１０．５／７１０ｎｍ、直径２９１ｎｍ、の円孔が周期的に配列した金の相補的積層構造のトップビュー画像が示される。この構造の高さは２３０ｎｍであった。

【００８７】

図７に示すシリコンナノロッド構造が蛍光増強を示すことを確認するため、該構造を有するＳＯＩ基板、および比較用の平坦なＳｉ基板のそれぞれにローダミン５９０（Ｒ５９０）分子を分散させ、波長５３２ｎｍの入射レーザ光を照射し、その際の蛍光スペクトルを測定し、比較した。その結果、シリコンナノロッド構造を有するＳＯＩ基板において、発光ピーク波長５９０ｎｍにおける発光強度の増大が確認された。この結果は、シリコンナノロッド構造が、波長５５０ｎｍ以上５７０ｎｍ以下、５８０ｎｍ以上６００ｎｍ以下、および６５０ｎｍ以上６９０ｎｍ以下の各波長範囲で蛍光増強を示すメタ表面であるとの、非特許文献１の報告にも合致するものである。

【００８８】

また、非特許文献３では、金の相補的積層構造(周期４１０.５／７１０ｎｍ、穴の直径２６５ｎｍ)、および比較用の平坦なＳｉ基板のそれぞれにＲ５９０分子を分散させ、蛍光スペクトルを測定し、比較することにより、金の相補的積層構造を用いた場合に、５５０ｎｍ以上６００ｎｍ以下、６５０ｎｍ以上７００ｎｍ以下および７５０ｎｍ以上８００ｎｍ以下の波長域において発光強度が増大したとされている。このように、金の相補的積層構造(周期４１０.５／７１０ｎｍ、円の直径２６５ｎｍ)も、５５０ｎｍ以上６００ｎｍ以下の範囲で蛍光増強を示すメタ表面であることが知られている。

【００８９】

金の相補的積層構造が他の波長の蛍光増強も示すことを確認するため、金の相補的積層構造(周期４１０.５／７１０ｎｍ、穴の直径２５０ｎｍ)を有する基板、および比較用の平坦なＳｉ基板のそれぞれにＩＲ７８３分子を分散させ、蛍光スペクトルを測定し、比較した。その結果、金の相補的積層構造を有する基板において、波長８５０ｎｍ以上９００ｎｍ以下における発光強度の増大が確認された。このことから、金の相補的積層構造(周期４１０.５／７１０ｎｍ、円の直径２５０ｎｍ)は、８５０ｎｍ以上９００ｎｍ以下の範囲においても蛍光増強を示すメタ表面であることを確認した。

【００９０】

［試料］

捕捉分子には、プロテインＡＧ－シスまたはシス－ストレプトアビジン（ＣｌｉｃｋＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、ＰＲＯ１００１またはＰＲＯ１００５）を用いた。捕捉抗体には抗アビジン抗体（アブカム、ａｂ５３４９４）を用いた。

標的生体分子にはイミュノグロブリンＧ（ＩｇＧ、アブカム、ａｂ２０６２０２）、ｐ５３抗体（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、ＮＢ２００－１７１）、マウスモノクローナルｐ５３抗体（アブカム、ａｂ１６４６５）、ＣＥＡ（アブカム、ａｂ７４２）、および、蛍光分子（ＡＦ５５５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５５５）標識済みｐ５３抗体（アブカム、ａｂ２１０７１７）、蛍光分子（ＡＦ５５５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５５５）標識済みヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（アブカム、ａｂ１５０１１４）、蛍光分子（ＡＦ５

５５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５５５）標識済みヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（アブカム、ａｂ１５００７８）、または、蛍光分子（ＤＬ５５５、ＤｙＬｉｇｈｔ５５５）標識済みＩｇＧ（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、ＮＢＰ１－７６０５５）を用いた。

また、ビオチン標識キット（和光純薬３４７－９０８９１）、蛍光分子ＨｉＬｙｔｅ５５５（ＨＬ５５５）標識キット（和光純薬３４８－９０１４１）、蛍光分子インドシアニングリーン（ＩＣＧ）標識キット（和光純薬３４５－９１４３１）を使用し、必要に応じて、標的生体分子に蛍光標識、ビオチン標識を付した。

【００９１】

以降の実施例１～実施例８および比較例１～比較例２では、上述のメタ表面を用いて検査チップを製造し、上述の試料を用いて蛍光測定を行った。

【００９２】

［実施例１］

実施例１では、周期４００ｎｍ、直径３２０ｎｍである円柱状シリコンナノロッド構造のメタ表面１１０（図１）の第１の基板１２０（図１）に、マイクロ流路（流路高さＤ３０μｍ）を有するポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）製の第２の基板１４０（図１）を自己吸着により貼り合わせ、検査チップを構成した。検査チップの外観を図９（Ａ）に、これを配置した流路装置の外観を図９（Ｂ）に、それぞれ示す。なお、ＰＤＭＳは、可視光の平均透過率が６０％以上であることが知られている。

【００９３】

図９は、実施例１の検査チップおよびこれを配置した流路装置の外観を示す図である。

【００９４】

前述のとおり、検査チップは、シリコンナノロッド構造のメタ表面１１０（図１）を有する第１の基板１２０（図１）に、マイクロ流路を有するポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）製の第２の基板１４０（図１）を自己吸着させて構成されている。このため、検査チップの作製工程は著しく簡素化された。

【００９５】

図９（Ａ）によれば、検査チップは３つのマイクロ流路（マイクロチャネル）を有し、各流路内にメタ表面１１０が配置されていることが分かる。このような構成により、標的生体分子の固定と蛍光検出とを、流路数に応じて、複数の標的生体分子に対して並行して行うことが可能となる。図中の横長の六角形の中心に矩形のメタ表面が位置する。図の右に位置する供給口から試料等を供給し、図の左に位置する排出口から廃液を排出するように構成されている。図９（Ｂ）は、検査チップに対して外部からの試薬の流入、および外部への試薬の排出を行うための接続チューブ、ならびに検査チップを覆うカバーを配置した流路装置の写真である。このカバーは、検査チップの押さえの役割を兼ねており、第１の基板と第２の基板との自己吸着のみによって流路が封止される検査チップにおいて、液漏れを生じさせない働きがある。

【００９６】

実施例１の検査チップおよび流路装置を用いて、次のようにして蛍光標識化された標的生体分子の検出を行った。接続チューブの供給口から検査チップのマイクロ流路にＰＢＳを４分間流し、リンスした。次いで、捕捉分子として、プロテインＡＧ－シスのＰＢＳ希釈液（濃度１４６μｇ／ｍＬ）を連続的に２０分間流した後、再びＰＢＳでマイクロ流路内を４分間リンスした。流量レートは１０μＬ／分であった。次いで、標的生体分子として、ＨＬ５５５で蛍光標識化したＩｇＧ分子のＰＢＳ希釈液（濃度５ｎｇ／ｍＬ、０．５ｎｇ／ｍＬおよび０．０５ｎｇ／ｍＬ）４００μＬをそれぞれ、検査チップの各マイクロ流路に間欠的（ＯＮ／ＯＦＦ＝１／３）に流した。平均流量レートは８μＬ／分であった。その後、ＰＢＳでマイクロ流路をリンスして、浮遊分子および非特異吸着分子を除き、乾燥窒素をフローしてマイクロ流路内を乾燥させた。

【００９７】

マイクロ流路内を乾燥させた検査チップを図５に示す検出装置にセットし、蛍光測定を行った。光源５１０として波長５３２ｎｍの光を発するレーザ（ＡＴＯＫ社製、型番Ａｃ

ｔｉｏｎ５３２Ｑ－００５０）を用い、検出手段５２０としてイメージング分光検出器（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ－Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社製、型番ＩｓｏＰｌａｎｅ１６０－ＰｒｏＥＭ１０２４ＨＳ）を用いた。メタ表面上に照射されたレーザ光パワーは０．１７ｍＷであり、測定時間は２０秒であった。測定後の検査チップをＳＥＭ観察した結果を図１１に示す。ＨＬ５５５で蛍光標識された標的生体分子の希釈液(濃度５ｎｇ／ｍＬ)を流したメタ表面上で測定した蛍光スペクトルを図１２に示す。蛍光スペクトルから得られる標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図１４に示す。

【００９８】

［実施例２］

実施例２では、周期３００ｎｍ、直径２３６ｎｍである円柱状シリコンナノロッド構造のメタ表面を用いた以外は実施例１と同様にして検査チップおよび流路装置を構成した。得られた検査チップの外観は図９（Ａ）と同様であり、流路装置の外観は図９（Ｂ）と同様であった。

【００９９】

実施例２では、標的生体分子を、ＡＦ５５５を蛍光標識したＩｇＧ分子とした。この標的生体分子のＰＢＳ希釈液（濃度２ｎｇ／ｍｌ、０．１ｎｇ／ｍｌおよび０．００５ｎｇ／ｍｌ）２５０μＬをそれぞれ、検査チップの各マイクロ流路に流した。流量レートは８．３μＬ／分であった。ＰＢＳによるリンスは実施例１と同様に行った。実施例２の標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図１５に示す。

【０１００】

［実施例３］

実施例３では、周期４１０．５／７１０ｎｍ、穴の直径３０２ｎｍである金の相補的積層構造のメタ表面１１０（図１）を有する第１の基板１２０（図１）に、マイクロ流路（流路高さ３０μｍ）を有するＰＤＭＳ製の第２の基板１４０（図１）を自己吸着により貼り合わせ、検査チップを構成した。この検査チップの外観を図１０に示す。

【０１０１】

図１０は、実施例３の検査チップの外観を示す図である。

【０１０２】

前述のとおり、検査チップは、金の相補的積層構造からなるメタ表面１１０（図１）を有する第１の基板１２０（図１）に、マイクロ流路を有するＰＤＭＳ製の第２の基板１４０（図１）を自己吸着させて構成されている。このため、検査チップの作製工程は著しく簡素化された。

【０１０３】

図１０によれば、検査チップは３つのマイクロ流路（マイクロチャネル）を有し、各流路内にメタ表面が配置されていることが分かる。このような構成により、標的生体分子の固定と蛍光検出とを、流路数に応じて、複数の標的生体分子に対して並行して行うことが可能となる。図中の横長の六角形の中心に矩形のメタ表面が位置する。図の右に位置する供給口から試料等を供給し、図の左に位置する排出口から廃液を排出するように構成されている。検査チップは、図９（Ｂ）で示したカバーを用いて押さえられると共に、接続チューブに接続されて、流路装置を構成した。

【０１０４】

標的生体分子として、ＨＬ５５５で蛍光標識したＩｇＧ分子をさらにビオチン標識して用いた以外は、実施例１と同様の手順で、標的生体分子の検出を行った。標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図１６に示す。

【０１０５】

［実施例４］

実施例４では、直径３１６ｎｍである円柱状シリコンナノロッド構造のメタ表面を有する第１の基板を用いた以外は、実施例１と同様にして検査チップを構成した。検査チップの外観は、図９（Ａ）と同様であった。標的生体分子として、ＡＦ５５５で蛍光標識された腫瘍マーカーであるｐ５３抗体を用いた以外は、実施例１と同様の手順で、標的生体分

子の検出を行った。標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図１７に示す。

【０１０６】

［実施例５］

実施例５では、穴の直径が２９１ｎｍである金の相補的積層構造のメタ表面を有する第１の基板を用いた以外は、実施例３と同様にして検査チップを構成した。検査チップの外観は図１０と同様であった。捕捉分子としてシス－ストレプトアビジンを用いると共に、標的生体分子として、ＨＬ５５５で蛍光標識したｐ５３抗体をさらにビオチン標識して用いた以外は、実施例１と同様の手順で標的生体分子の検出を行った。標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図１８に示す。

【０１０７】

［実施例６］

実施例６では、実施例５で作製した検査チップおよび流路装置を用いて、捕捉抗体の有無による標的生体分子の検出効率を比較した。

【０１０８】

まず、標的生体分子の濃度を５０ｎｇ／ｍＬとした以外は、実施例１と同様の手順で標的生体分子の検出を行った。次に、ＰＢＳでリンスした実施例５の流路装置に、標的生体分子を流す前に、捕捉抗体として、抗ビオチン抗体希釈液（濃度１０μｇ/ｍＬ）を２５分間流した以外は同様の手順で標的生体分子の検出を行った。捕捉抗体の有無による蛍光強度を比較した。結果を図２１に示す。

【０１０９】

［実施例７］

実施例７では、周期４００ｎｍ、直径３０２ｎｍである円柱状シリコンナノロッド構造のメタ表面を有する第１の基板を用いると共に、ＰＤＭＳ製の第２の基板に形成されたマイクロ流路の流路高さＤを１５μｍとした以外は、実施例１と同様にして検査チップおよび流路装置を構成した。検査チップの外観は、図９（Ａ）と同様であり、流路装置の外観は図９（Ｂ）と同様であった。得られた流路装置を用い、実施例１と同様の手順で標的生体分子の検出を行った。標的生体分子として、ＡＦ５５５で蛍光標識されたＩｇＧ分子をさらにビオチン標識して用いた。ここで、ＩｇＧ濃度は５ｎｇ／ｍｌ、０．３３ｎｇ／ｍｌおよび０．０２２ｎｇ／ｍｌとした。

【０１１０】

［比較例１］

比較例１では、周期４００ｎｍ、直径３０２ｎｍである円柱状シリコンナノロッド構造のメタ表面を用いた以外は、実施例１と同様にして、検査チップおよび流路装置を構成し、標的生体分子の検出を行った。標的生体分子の濃度は、５０ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬおよび０．５ｎｇ／ｍＬとした。蛍光検出の測定時に、ＰＤＭＳ製の第２の基板を除去してメタ表面を有する基板（第１基板）単独について測定し、マイクロ共振器を通して検出する実施例との比較を行った。標的生体分子の蛍光検出は、実施例１と同様の手順で行った。濃度が５０ｎｇ／ｍＬの標的生体分子についての蛍光スペクトルを図１３に示す。蛍光スペクトルから得られた標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図１９に示す。

【０１１１】

［比較例２］

比較例２では、穴の直径が２５０ｎｍである金の相補的積層構造のメタ表面を有する第１の基板のみを単独で用いた。捕捉分子として、プロテインＡのＰＢＳ希釈液５００ｎｇ／ｍＬをメタ表面に滴下し、表面への固定のため、室温・湿潤環境で１時間保持したのち、ＰＢＳでリンスした。次いで、標的生体分子として、ＩＣＧ標識したＩｇＧ分子のＰＢＳ希釈液２μＬ（濃度９０ｎｇ／ｍＬ、９０００ｎｇ／ｍＬおよび４５００００ｎｇ／ｍＬ）を、別々に準備した基板のメタ表面にそれぞれ滴下し、室温・湿潤環境下で２時間インキュベーションした。その後、ＰＢＳでリンスして固定されていない浮遊分子などを除去し、乾燥窒素をフローしてメタ表面を乾燥させた。

【０１１２】

実施例１と同様の手順で標的生体分子の検出を行った。標的生体分子濃度と蛍光強度との関係を図２０に示す。

【０１１３】

［実施例８］

実施例８では、穴の直径が３１５ｎｍである金の相補的積層構造のメタ表面を有する第１の基板を用いた以外は、実施例３と同様にして検査チップおよび流路装置を構成した。検査チップの外観は図１０と同様であった。

【０１１４】

実施例８の検査チップおよび流路装置を用いて、蛍光標識化されていない標的生体分子の検出を次のように行った。流路装置における接続チューブの供給口から検査チップのマイクロ流路にＰＢＳを５分間流し、流路内を液体で満たした。次いで、捕捉分子として、プロテインＡＧ－シスのＰＢＳ希釈液（濃度１４６μｇ／ｍＬ）を２３分間流した。流量レートは１１μＬ／分であった。その後、ＰＢＳでマイクロ流路内を６分間リンスした。引き続き、標的生体分子として、蛍光標識化していないｐ５３抗体のＰＢＳ希釈液３６０μＬ（濃度１ｎｇ／ｍＬ）をマイクロ流路に流した。流量レートは７．７μＬ／ｍＬであった。再びＰＢＳでマイクロ流路内を１０分間リンスした。次いで、ＤＬ５５５で蛍光標識されたヤギ・ポリクローナル、抗ウサギＩｇＧを二次抗体として４００μＬ（濃度９．１μｇ／ｍＬ）を流し、ＰＢＳでマイクロ流路をリンスして、浮遊分子および非特異吸着分子を除き、乾燥窒素をフローしてマイクロ流路内を乾燥させた。

【０１１５】

マイクロ流路内を乾燥させた検査チップを図５に示す検出装置にセットし、蛍光像の測定を行った。光源５１０として、波長５３２ｎｍ帯の発光ダイオードを用い、検出手段５２０としてＣＣＤカメラ（Ｌｕｍｅｎｅｒａ社製、型番ＩＮＦＩＮＩＴＹ－３Ｓ）を用いた。測定時間は２秒であった。ＣＣＤカメラによる蛍光像を図２２に示す。

【０１１６】

分かりやすさのため、実施例１～８および比較例１～２の検査チップの一覧および実験条件を表１および表２にまとめて示し、以上の結果を説明する。

【０１１７】

【表１】

例	第１の基板					蛍光増強の範囲(nm)	第２の基板	距離D(μm)
	メタ表面	材料	直径(nm)	周期(nm)	高さ(nm)		材料	
実施例１	ナノロッド	Si	320	400	200	550-570,580-600,650-690	PDMS	30
実施例２	ナノロッド	Si	236	300	200	550-570,580-600,650-690	PDMS	30
実施例３	相補的積層	Au/SOI	302	410.5/710	230	550-600,650-700,750-800	PDMS	30
実施例4	ナノロッド	Si	316	400	200	550-570,580-600,650-690	PDMS	30
実施例5	相補的積層	Au/SOI	291	410.5/710	230	550-600,650-700,750-800	PDMS	30
実施例６	相補的積層	Au/SOI	291	410.5/710	230	550-600,650-700,750-800	PDMS	30
実施例7	ナノロッド	Si	302	400	200	550-570,580-600,650-690	PDMS	15
比較例１	ナノロッド	Si	302	400	200	550-570,580-600,650-690	–	–
比較例２	相補的積層	Au-SOI	250	410.5/700	230	850-900	–	–
実施例８	相補的積層	Au/SOI	315	410.5/710	230	550-600,650-700,750-800	PDMS	30

表１：検査チップの一覧

【０１１８】

【表２】

例	捕捉分子	捕捉抗体	生体分子	蛍光標識
実施例１	プロテインAG・シス	－	IgG	HL555
実施例２	プロテインAG・シス	－	IgG	AF555
実施例3	プロテインAG・シス	抗ビオチン抗体	IgG*1	HL555
実施例4	プロテインAG・シス	－	p53抗体	AF555
実施例5	シス・ストレプロアビジン	－	p53抗体	HL555
実施例6	プロテインAG・シス	抗ビオチン抗体	IgG*1	HL555
実施例7	プロテインAG・シス	抗ビオチン抗体	IgG*1	AF555
比較例１	プロテインAG・シス	－	IgG	HL555
比較例２	プロテインAG・シス	－	IgG	ICG
実施例8	プロテインAG・シス	－	IgG*2	DL555*3

表２：実験条件の一覧
＊１：ビオチンで標識化された蛍光標識付生体分子
＊２：蛍光標識のない生体分子
＊３：蛍光標識付の二次抗体

【０１１９】
図１１は、検査後の実施例１の検査チップの様子を示す図である。
【０１２０】
図１１（Ａ）は、検査後の実施例の検査チップの外観を示し、メタ表面を含む低倍率のＳＥＭ像である。マイクロ流路の境界が鮮明に映し出されており、液流の有無による基板表面状態の差異が明瞭に観察される。この結果は液漏れが生じていないことを支持している。図１１（Ｂ）は、メタ表面の上面のＳＥＭ像である。図１１（Ｂ）によれば、捕捉分子、生体分子等が凝集している様子は見られなかった。このことから、実施例１の手順により、捕捉分子、生体分子等は、本発明の検査チップのメタ表面に凝集して複合体などを形成することなく、分子レベルで個別に最表面に固定できたことが示唆される。図示しないが、他の実施例の検査チップにおいても、同様に、液漏れはなかった。
【０１２１】
図１２は、実施例１の検査チップを用いた発光スペクトルを示す図である。
図１３は、比較例１の検査チップを用いた発光スペクトルを示す図である。
【０１２２】
図１２は、実施例１の検査チップについて、ＨＬ５５５で標識されたＩｇＧ分子の濃度５ｎｇ／ｍｌの標的生体分子を流した後に測定した発光スペクトルを示す。図１２によれば、波長５７０ｎｍ付近に発光ピーク、６１０ｎｍ付近に発光の２次ピークを示し、この発光は、ＩｇＧに蛍光標識されたＨＬ５５５に基づく蛍光であることが確認できた。このことから、本発明の検査チップが蛍光増強する波長領域（表１を参照）は、ＨＬ５５５の蛍光の波長範囲内に確かに存在し、本発明の検査チップを用い、図６に示す手順によって、蛍光標識化された標的生体分子を蛍光検出法により検出できることが確認された。
【０１２３】
さらに、図１２に示されるように、実施例１による発光スペクトルは周期１０ｎｍ程度の短い周期の干渉縞を示す。一方、図１３に示されるように、比較例１による発光スペクトルは同様の干渉縞を示さなかった。また、図示しないが、比較例２による発光スペクトルも同様に、マイクロ共振器に由来する干渉縞を示さなかった。
【０１２４】
図１２の結果と比較例１および２の結果とから、マイクロ流路を有する第２の基板１４０（図１）を検査チップに用いることにより、第１の基板１２０（図１）のメタ表面１１０（図１）と第２の基板１４０（図１）との間で蛍光が共振したのち、第２の基板を通して放射されたことを示しており、メタ表面を有する第１の基板およびマイクロ流路を有す

る第２の基板と、これらの間のマイクロメートルオーダの空間とによって、マイクロ共振器が成立していることを示す。

【０１２５】

図示しないが、他の実施例２～８の検査チップを用いた発光スペクトルも同様にマイクロ共振器に由来する干渉縞を示しており、メタ表面を有する第１の基板とマイクロ流路を有する第２の基板とは、マイクロ共振器として機能し、この間で蛍光がマイクロ共振器から放射されたことを確認した。また、これらの結果から、第１の基板と第２の基板との間で蛍光が共振するために好適な基板間の距離は、１５μｍ以上５０μｍ以下であることが分かった。

【０１２６】

図１４は、実施例１による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

図１５は、実施例２による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

図１６は、実施例３による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

図１７は、実施例４による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

図１８は、実施例５による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

図１９は、比較例１による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

図２０は、比較例２による蛍光測定から得た標準曲線を示す図である。

【０１２７】

図１４は、実施例１における蛍光スペクトルから波長５９０ｎｍ以上５９８ｎｍ以下の信号強度を積算し、標的生体分子の濃度に対してプロットして得られる標準曲線を示している。図１５～図２０は、それぞれ、実施例２～５および比較例１～２による蛍光スペクトルから、同様に信号強度を積算し、標的生体分子の濃度に対してプロットして得られる標準曲線である。

【０１２８】

図１４によれば、実施例１の検査チップを用いた場合、０．０５ｎｇ／ｍｌの低濃度においても蛍光信号は観測された。さらに、黒点線で示すように蛍光強度は、ＩｇＧ分子濃度に対してべき乗の応答を示しており、測定を行った濃度では、検出限界を示唆するプラトー（一定値）には未だ達していないことが分かる。

【０１２９】

図１５によれば、実施例２の検査チップを用いた場合、標的生体分子の濃度が０．００５ｎｇ／ｍＬ（換算すると、０．０３４ｐＭ，Ｍはモーラー、すなわち、モル／リットル）の低濃度であっても、信号（蛍光強度）が検出されたことが分かる。このことは、マイクロ共振器を形成する本発明の検査チップが、効率的に標的生体分子を検出できることを示す。さらに、濃度ｘに対する信号ｙの減衰率は、図中の黒点線で示すｙ＝ｘ＾０．４で近似できることが分かった。このことは、信号の減衰が濃度に対して極めて小さいことを示しており、より低濃度（例えば、１ｐｇ／ｍＬのオーダ）の標的生体分子であっても、本発明の検出チップを用いて蛍光検出できることを示唆する。すなわち、本発明の検査チップを用いれば、エライザ法で検出可能とされている保証値１７ｎｇ／ｍＬ（ＨＲＰ標識付きＩｇＧ、アブカム、ａｂ６７２１）に対して約３４０００倍の検出感度で標的生体分子を検出できる。

【０１３０】

図１６～図１８（実施例３～５）によれば、図１４（実施例１）と同様に、低濃度域においても蛍光信号が観測され、標的生体分子を検出できたことが分かる。図示しないが、実施例７の検査チップを用いた場合も、同様に、低濃度領域においても標的生体分子を検出できた。このことから、本発明の検出チップは、金属の相補的積層構造またはナノロッド構造であるメタ表面を有する第１の基板と、マイクロ流路を備えた第２の基板とを対向させてマイクロ共振器を構成することにより、標的生体分子の種類に関わらず、低濃度の生体分子の蛍光検出に好適であることが示された。

【０１３１】

一方、図１９（比較例１）によれば、濃度ｘに対する信号ｙの減衰率は、ｙ∝ｘ^０．６

で表され、標的生体分子濃度の減少と共に信号が急激に減衰することが分かった。このことから、本発明の検査チップにおける蛍光の放射制御が、低濃度の標的生体分子の検出に対して有効であることが示された。

【０１３２】

また、図２０（比較例２）によれば、標的生体分子濃度の減少と共に、さらに急激に信号が減衰することが分かった。図１４～図１８と、図２０とを比較すると、本発明の検査チップにおいて、マイクロ流路による試料の輸送により、メタ表面に効率的に捕捉分子が固定され、さらに効率的に標的生体分子が捕捉されていることが分かった。

【０１３３】

図２１は、実施例６による捕捉抗体の有無による蛍光強度の比較を示す図である。

【０１３４】

図２１によれば、捕捉抗体として抗ビオチン抗体を用いることにより、検出強度が１９倍となった。このことから、本発明の検査チップを用い、蛍光検出法により標的生体分子を検出する場合、ビオチン・抗ビオチン結合反応を生じる捕捉抗体を用いることにより、特異的な結合を促進し、結果として、より高感度な検出が可能となることが分かった。

【０１３５】

図２２は、実施例８による検査チップの蛍光像である。

【０１３６】

図２２では、グレースケールで示されるが、白く示される領域が黄色く発光している。このことから、本発明の検査チップを用い、図６に示す手順を踏むことで、蛍光標識化されていない標的生体分子であっても、蛍光標識化された二次抗体を用いることによって検出できることが確認された。

【０１３７】

［実施例９］

実施例９では、実施例３と同じ検査チップおよび流路装置を使用し、再現性、ならびに、バッファー（緩衝液）の影響について調べた。

【０１３８】

実施例１と同様の手順で、捕捉分子としてシス－ストレプトアビジンを、標的生体分子としてＨＬ５５５で蛍光標識したＩｇＧ分子の希釈液（濃度１０ｎｇ／ｍＬ、ＮＳバッファー、１０％血清、全血清）を用いて、蛍光検出を行った。なお、比較のために、捕捉分子なし、ならびに、捕捉分子および標的生体分子ともになしの場合についても、蛍光検出を行った。

【０１３９】

実験例をまとめる。

実験１）実施例１と同様に捕捉分子を流路装置に流した後、ＮＳバッファー（Ａｂｃａｍ社製、ａｂ１９３９７２）で希釈した標的生体分子を、平均流量レート７μＬ／分で３０分間、流した。

実験２）標的生体分子を、９０％ＮＳバッファーおよび１０％ヒト血清で希釈した以外は、実験１と同様に行った。

実験３）事前に捕捉分子を流路装置に流さなかった以外は実験１と同様に行った。

実験４）実験１の測定の翌日に、再現性を確かめるため、同じ設計により作製したメタ表面を用いて、実験１と同様の実験を行った。

実験５）実施例１と同様に捕捉分子を流路装置に流した後、１００％ヒト血清で希釈した標的生体分子を、平均流量レート４μＬ／分で５０分間、流した。

実験６）バックグラウンド信号レベルを決定するために、捕捉分子および標的生体分子を流すことなく、ＮＳバッファーのみを平均流量レート７μＬ／分で３０分間、流路装置に流した。

【０１４０】

蛍光測定はＰＢＳによるリンス液でマイクロ流路が満たされた状態で、５２７ｎｍ帯のバンドパスフィルタで波長域を制限されたＬＥＤ光を励起光として行い、５９１ｎｍ帯の

蛍光バンドパスフィルタにより蛍光像をＣＣＤカメラで撮像することにより実施した。
【０１４１】
得られた蛍光測定の結果を図２３に示す。
【０１４２】
図２３において、測定番号１～６は、それぞれ、前述の実験１～実験６に相当する。実験１と実験４との比較から、本発明の検査チップは再現性に優れることが分かった。
【０１４３】
実験２の結果によれば、ヒト血清１０％をバッファーに用いた場合も、本発明の検査チップを用いれば、ＰＢＳのようなＮＳバッファーに比べてわずかに強度の低下がみられるものの、良好に蛍光検出できることが分かった。さらに驚くべきことには、全血清をバッファーに用いた場合も、蛍光強度は低下するものの、実験３（捕捉分子なし）や実験６（バックグラウンドシグナルレベル）に対して、十分に差別化できる蛍光強度を示した。このことから、本発明の検査チップは、ＮＳバッファーと同様に、血清も使用できることが示された。
【０１４４】
［実施例１０］
実施例１０では、実施例３と同じ検査チップおよび流路装置を使用し、マウスモノクローナルｐ５３抗体の間接的な検出を実施した。
【０１４５】
まず、捕捉分子としてシス－ストレプトアビジンのＰＢＳ希釈液（濃度２０μｇ／ｍＬ）を流量レート１１～１２μＬ／分で３０分間流した。次いで、ＰＢＳでマイクロ流路内を１０分間リンスした。次いで、流路装置の３つのチャネルのそれぞれに、ビオチン標識化したマウスモノクローナルｐ５３抗体（チャネル１）、ＮＳバッファー（チャネル２）およびビオチン標識化したマウスモノクローナルｐ５３抗体（チャネル３）を、流量レート１１～１３μＬ／分で３０分間流した。チャネル２をブランクとした。ビオチン標識化したマウスモノクローナルｐ５３抗体は、ＮＳバッファーで５μｇ／ｍＬまで希釈された。
【０１４６】
次いで、３つのチャネルをＰＢＳで１５分間洗浄し、チャネル１とチャネル２とに、蛍光分子標識済みヤギ抗マウスＡＦ５５５－ＩｇＧのＮＳバッファー希釈液を、チャネル３に蛍光分子標識済みヤギ抗ウサギＡＦ５５５－ＩｇＧのＮＳバッファー希釈液を、それぞれ３０分間流した。蛍光分子標識済みヤギ抗マウス抗体およびヤギ抗ウサギ抗体は、いずれも二次抗体であった。これらの希釈液の濃度は１００ｎｇ／ｍＬであり、平均流量レート１１～１２μＬ／分であった。その後、マイクロ流路をＰＢＳで１０分間リンスして、浮遊分子および非特異吸着分子を除き、乾燥窒素をフローしてマイクロ流路内を乾燥させた後、実施例９と同様にして蛍光測定を行った。
【０１４７】
図２４は、実施例１０による各チャネルの蛍光像および生体分子固定状態を示す模式図である。
図２５は、実施例１０による蛍光強度の比較を示す図である。
【０１４８】
図２４（Ａ）～（Ｃ）は、それぞれ、流路装置のチャネル１～３に配置した各検査チップの蛍光像と、模式的な結合状態とを示すものである。図２４（Ａ）によれば、チャネル１では、検査チップのメタ表面に固定された捕捉分子（シス－ストレプトアビジン）２４１０にマウスモノクローナルｐ５３抗体２４２０が固定され、さらに、二次抗体（蛍光分子標識済みヤギ抗マウスＡＦ５５５－ＩｇＧ）２４３０が固定されている。図中、白く示される領域は、二次抗体に基づく発光である。
【０１４９】
図２４（Ｃ）によれば、チャネル３では、チャネル１（図２４（Ａ）参照）と同様に、検査チップのメタ表面に固定された捕捉分子（シス－ストレプトアビジン）２４１０に、マウスモノクローナルｐ５３抗体２４２０が固定され、さらに、二次抗体（蛍光分子標識

済みヤギ抗ウサギＡＦ５５５－ＩｇＧ）２４４０が固定されている。図中、白い点線で示される領域が二次抗体に基づく発光である。この発光は、マウス・ウサギ間の異種交差反応による。

【０１５０】

一方、チャネル２には、標的生体分子（マウスモノクローナルｐ５３抗体）を流していないため、図２４（Ｂ）に示されるように、検査チップのメタ表面には、他のチャネルと同様に固定された捕捉分子（シス－ストレプトアビジン）２４１０と、偶発的、非特異的に固定された二次抗体（蛍光分子標識済みヤギ抗マウスＡＦ５５５－ＩｇＧ）２４３０とが存在するに留まる。チャネル２では発光がほとんど確認されなかったことから、本発明の検査チップでは、二次抗体の非特異吸着に起因する偽信号は十分小さいといえる。

【０１５１】

図２５のチャネル１とチャネル２との比較から、蛍光標識化されていない標的生体分子がメタ表面に存在する場合には、蛍光標識化された二次抗体を用いることによって、これを特異的に検出できることが確認された。

【０１５２】

さらに、図２５のチャネル１とチャネル３との比較から、マウスモノクローナルｐ５３抗体とヤギ抗ウサギ抗体との間で生じる交差反応は小さく、蛍光が抑制されることが分かった。このことは、蛍光強度の測定により、ｐ５３抗体を動物種ごとに選択的、特異的に検出できることを示唆している。

【０１５３】

［実施例１１］

実施例１１では、実施例３と同じ検査チップおよび流路装置を使用し、サンドウィッチ検定配置においてＣＥＡの間接的な検出を調べた。ＣＥＡは医療診断に使用される腫瘍マーカーである。

【０１５４】

まず、捕捉分子としてシス－ストレプトアビジンのＰＢＳ希釈液（濃度２０μｇ／ｍＬ）を５０分間、流路装置に流し、検査チップのメタ表面に捕捉分子を固定させた。次いで、ウサギモノクローナルである抗ＣＥＡ抗体（アブカム、ａｂ２２９０７４）、および、標的生体分子として天然タンパク質であるＣＥＡ（アブカム、ａｂ７４２）を準備した。抗ＣＥＡ抗体としては、ビオチン標識化したものと、そうでないものとを準備した。

【０１５５】

ビオチン標識化した抗ＣＥＡ抗体および抗ＣＥＡ抗体の濃度は、いずれもＮＳバッファーを用いて１００ｎｇ／ｍＬに調製した。ＣＥＡ濃度は、ＮＳバッファーを用いて、３０ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬおよび０．３ｎｇ／ｍＬの３種に調製した。

【０１５６】

ビオチン標識化した抗ＣＥＡ抗体（１００μＬ）、各濃度の標的生体分子ＣＥＡ（１００μＬ）、および、抗ＣＥＡ抗体（１００μＬ）の反応液を、室温（２９９Ｋ）にて、４００ｒｐｍで６０分間インキュベーションし、３種類の抗ＣＥＡ抗体－標的生体分子ＣＥＡ－ビオチン標識化した抗ＣＥＡ抗体のサンドイッチ複合体カクテルを形成した。各カクテル中の標的ＣＥＡの終濃度はそれぞれ、１０ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬおよび０．１ｎｇ／ｍＬであった。

【０１５７】

各カクテルを、平均流量レート１０μＬ／分で２８分間、流路装置の各チャネルに流し、ＥＬＩＳＡキット内で洗浄用バッファー（アブカム、ａｂ１９５２１５）を１０分間流し、ＰＢＳで１０分間リンスした。

【０１５８】

次いで、二次抗体として蛍光分子標識済みＡＦ５５５－ＩｇＧを平均流量レート９μＬ／分で３０分間各チャネルに流した。ＡＦ５５５－ＩｇＧは、ヤギ－ポリクローナル抗ウサギ抗体（アブカム、ａｂ１５００７８）であった。ＰＢＳで１０分間チャネルをリンスした後、実施例９と同様にして蛍光測定を行った。

【０１５９】
図２６は、実施例１１による検査チップのメタ表面の上の分子の様子を示す模式図である。
【０１６０】
図２６によれば、メタ表面上に捕捉分子（シス－ストレプトアビジン）が固定され、それに抗ＣＥＡ抗体－標的生体分子ＣＥＡ－ビオチン標識化した抗ＣＥＡ抗体のサンドイッチ複合体が固定されている様子が示される。標的生体分子ＣＥＡは、ラベルフリーである（蛍光標識を有していない）が、蛍光検出できる。
【０１６１】
さらに、図２６によれば、サンドイッチ複合体のビオチン標識化した抗ＣＥＡ抗体に二次抗体としてＡＦ５５５－ＩｇＧが固定されている様子が示される。二次抗体はポリクローナルであるため、二次抗体同士で結合を生じ、蛍光増幅する。
【０１６２】
図２７は、実施例１１による種々の濃度のＣＥＡの蛍光像を示す図である。
図２８は、実施例１１による蛍光測定から得たＣＥＡの蛍光強度の濃度依存性を示す図である。
【０１６３】
図２７では、グレースケールで示されるが、白く示される領域が黄色く発光している。図２７によれば、サンドイッチ複合体中の標的生体分子ＣＥＡ濃度が増大するにつれて、メタ表面（図中の矩形の領域）の蛍光強度も増大した。注目すべきは、二次抗体は、検査チップのメタ表面以外の領域にも流されているが、メタ表面以外の領域において有意な蛍光は見られなかったことである。このことから、二次抗体は、サンドイッチ複合体のビオチン標識化した抗ＣＥＡ抗体に特異的に結合したと言える。
【０１６４】
図２８において、点線は次式のＨｉｌｌの式を用いたフィッティング曲線である。

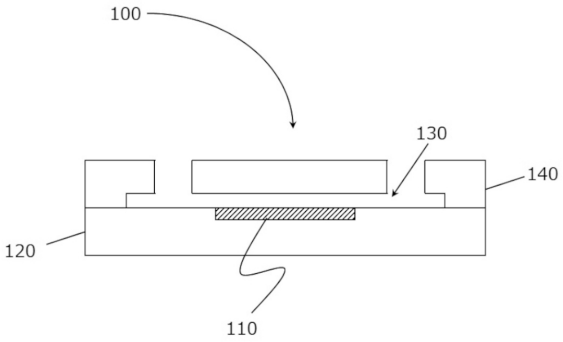
$$y = y_0 + (S - y_0)\, x^n / (x^n + K_D^n)$$

ここで、ｙは蛍光強度であり、y_0は蛍光測定におけるバックグラウンドレベルであり、Ｓは飽和信号強度であり、ｘは標的生体分子の濃度であり、ｎは共同的反応の程度であり、K_Dは乖離定数である。
【０１６５】
図２８によれば、プロファイルはフィッティング曲線によく一致しており、蛍光強度が飽和領域から直線的に減少する部分が存在することから、高感度検出が達成されていることが分かる。現在のＣＥＡの医療診断の基準は５ｎｇ／ｍＬであるが、本発明の検査チップを用いれば、より低濃度であっても検出可能であり、定量的結果を精度よく提供できることが示された。
【０１６６】
さらに、ゼロ信号となるＣＥＡ濃度から３σ（σ：標準偏差）隔てたＣＥＡ濃度を求め、検出限界（ＬＯＤ）を統計的に評価したところ、ＬＯＤは０．８５ｐｇ／ｍＬ（図２８中に３σで示す）であった。このことは、バックグラウンドが理想的に抑制されている場合には、蛍光測定により極めて低濃度の標的生体分子ＣＥＡを検出できることを示唆する。
【産業上の利用可能性】
【０１６７】
本発明の蛍光検出用生体分子検査チップは、蛍光検出法により生体分子を検出するすべての技術に適用できる。本発明の検査チップを用いれば、標的生体分子が低濃度、例えば、１ｐｇ／ｍＬのオーダであっても高精度にできる。
【符号の説明】
【０１６８】
１００　蛍光検出用生体分子検査チップ
１１０、３００、４００　メタ表面
１２０　第１の基板

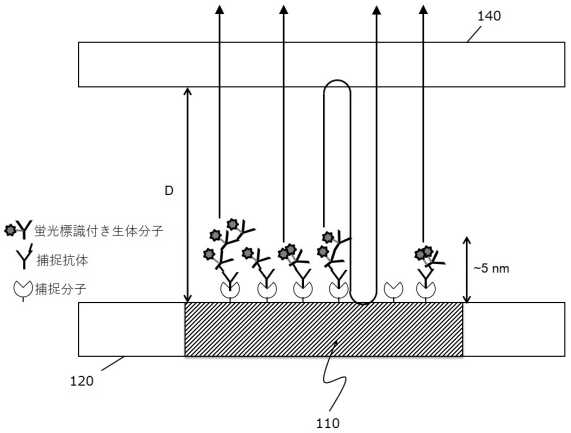
１３０　マイクロ流路
１４０　第２の基板
３１０、４１０　基材
３２０　スラブ材
３３０　金属材料
３４０　表面層
３５０　穴
３６０　穴側壁
４２０　ナノロッド
５００　検出装置
５１０　光源
５２０　検出手段
５３０　フィルタ
５４０　コンピュータ
５５０　出力装置

【図面】

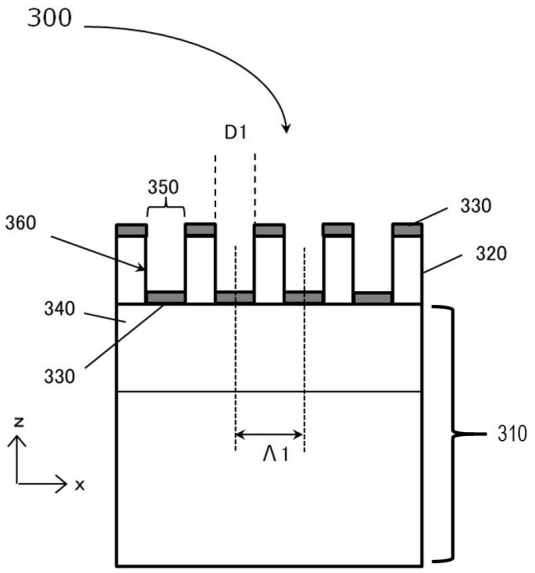
【図１】



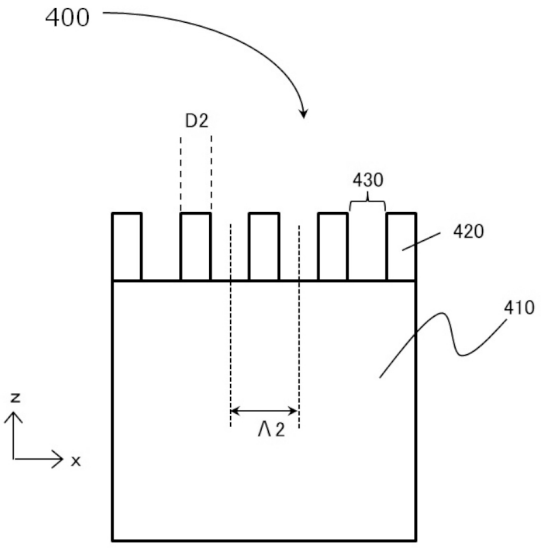
【図２】



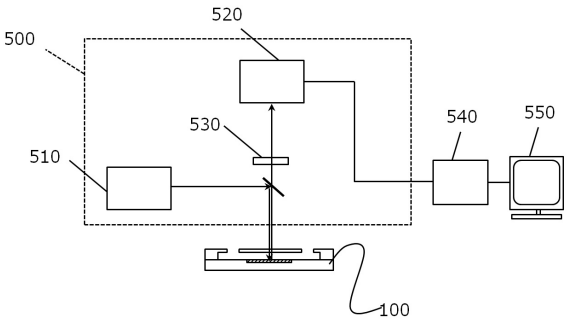
【図３】


300
D1
350
360
330
320
340
330
310
Λ1
z
x

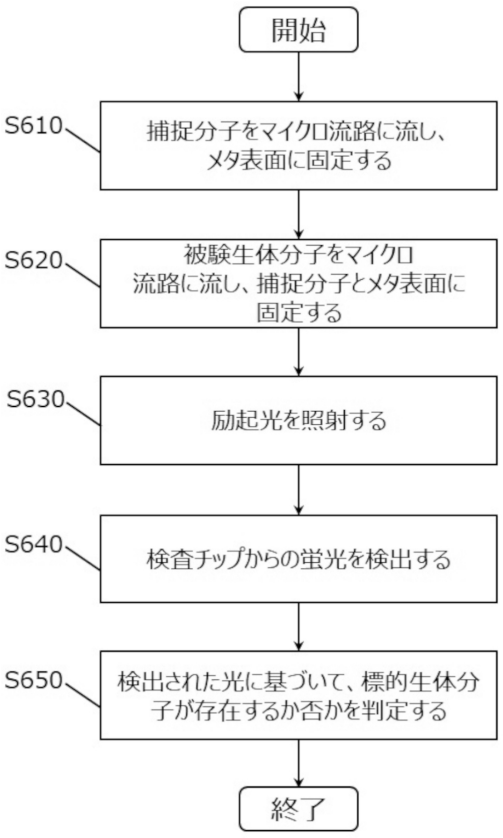
【図４】


400
D2
430
420
410
Λ2
z
x

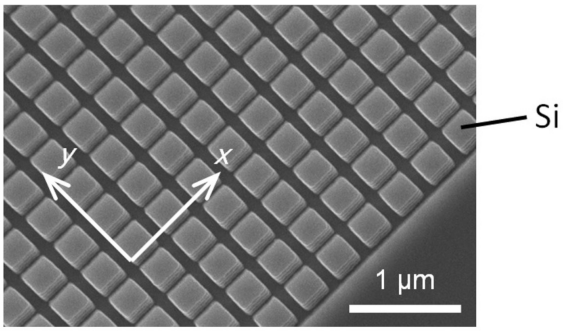
【図５】


520
500
530
540
550
510
100

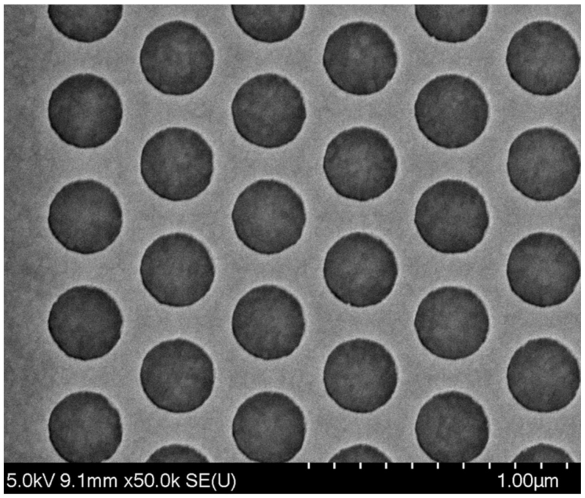
【図６】


開始
S610
捕捉分子をマイクロ流路に流し、メタ表面に固定する
S620
被験生体分子をマイクロ流路に流し、捕捉分子とメタ表面に固定する
S630
励起光を照射する
S640
検査チップからの蛍光を検出する
S650
検出された光に基づいて、標的生体分子が存在するか否かを判定する
終了

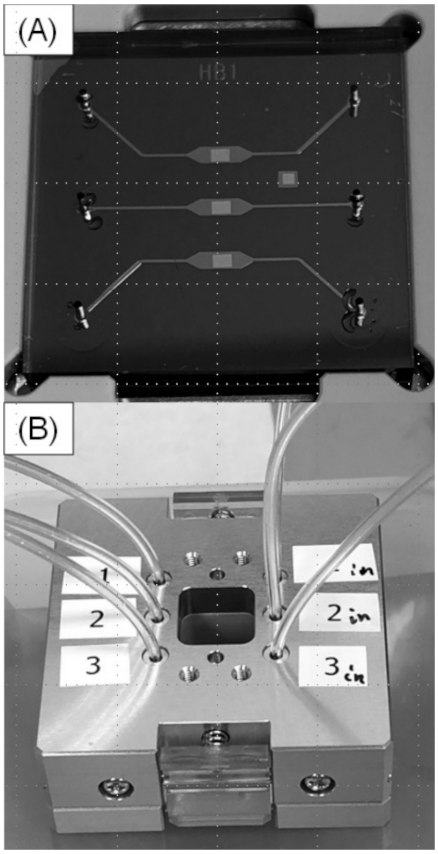
【図７】



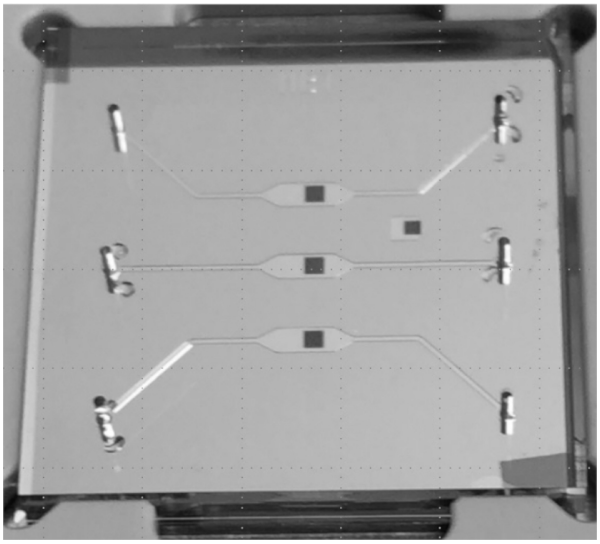
【図８】



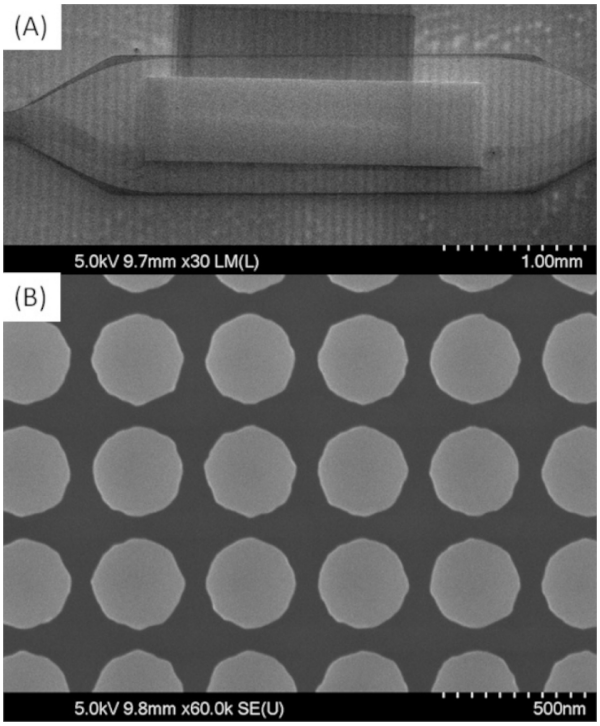
【図９】



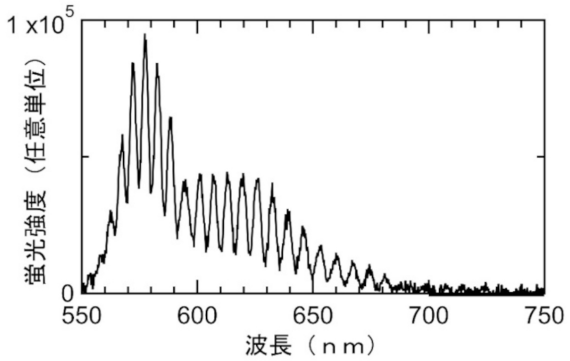
【図１０】



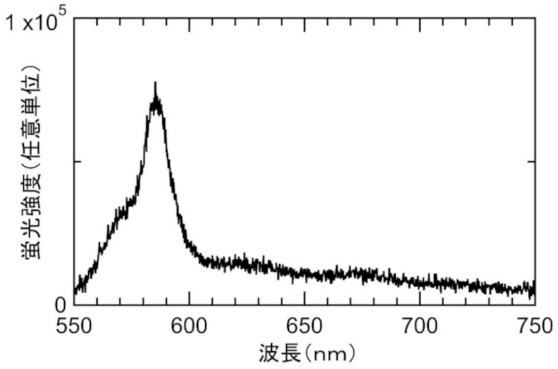
【図１１】



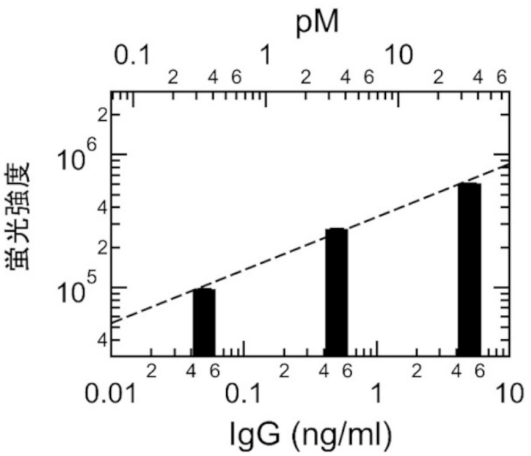
【図１２】



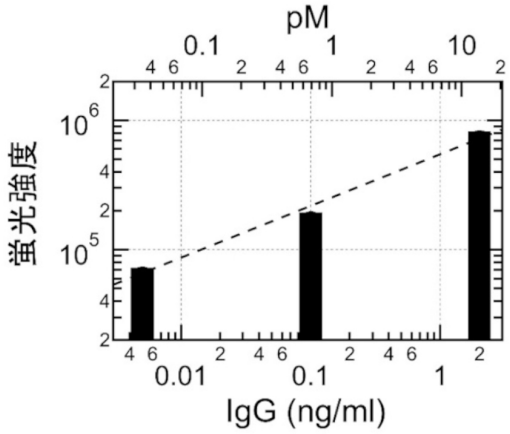
【図１３】



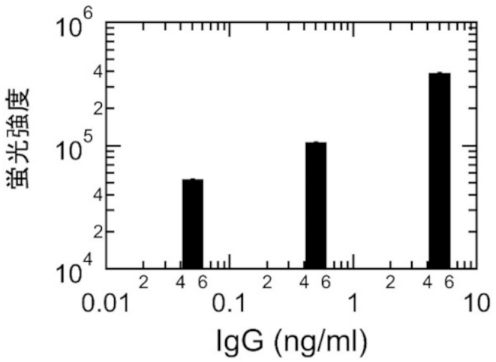
【図１４】



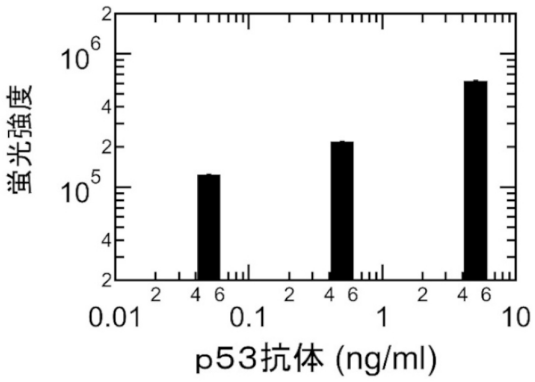
【図１５】



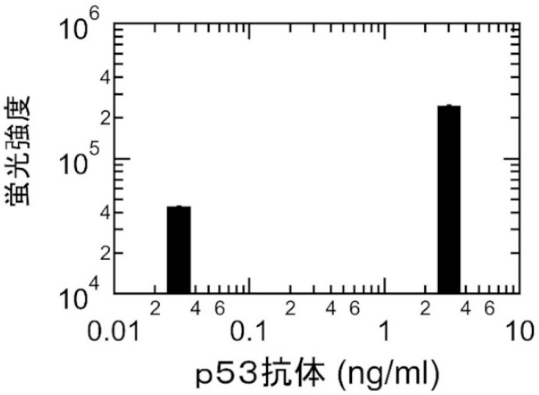
【図１６】



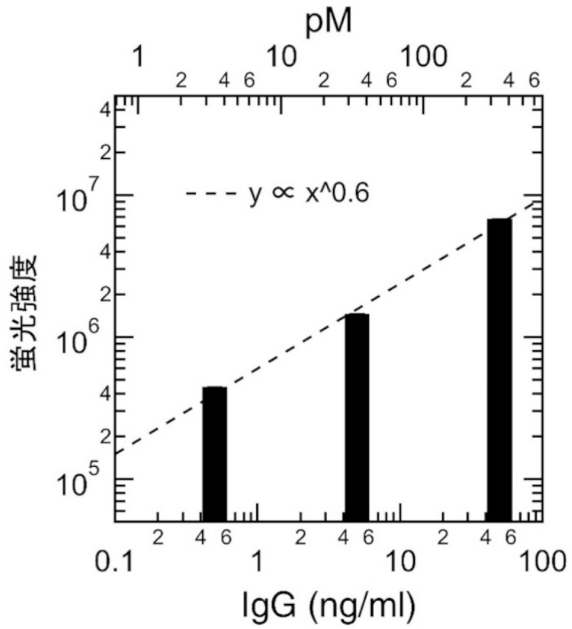
【図１７】



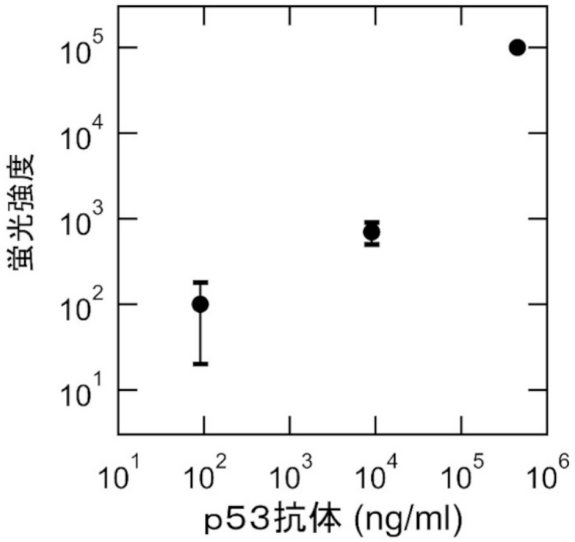
【図１８】



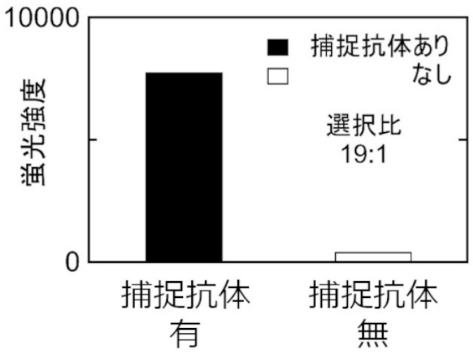
【図１９】



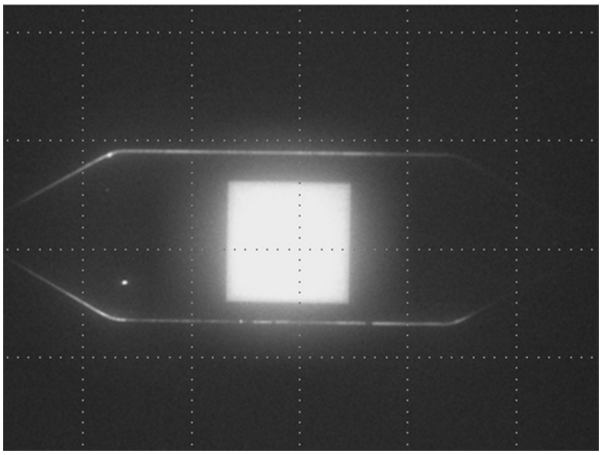
【図２０】



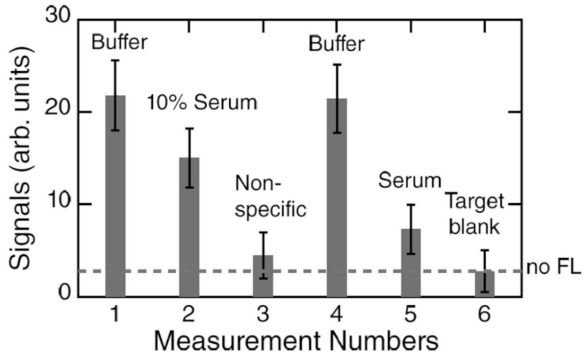
【図２１】



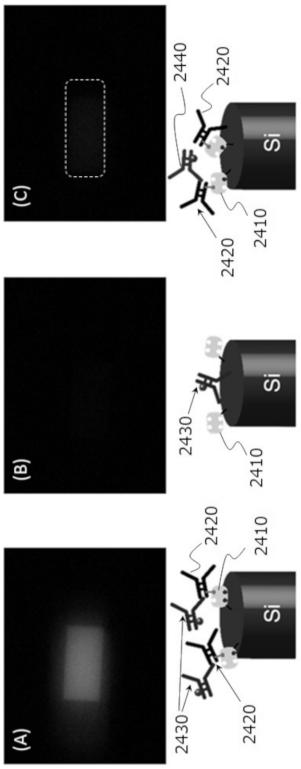
【図２２】



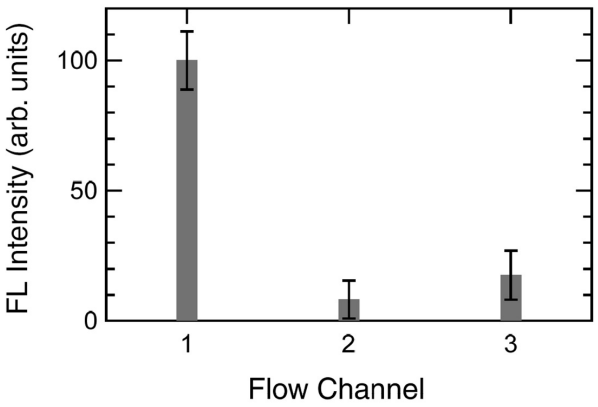
【図２３】



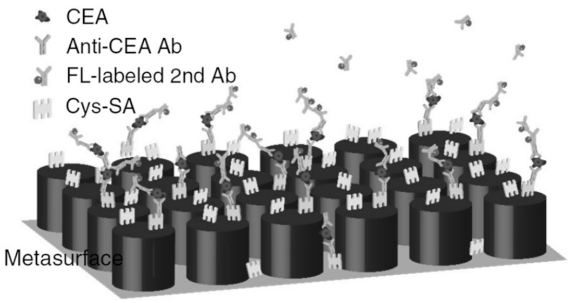
【図２４】



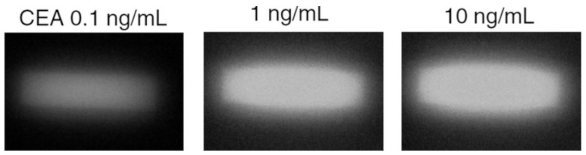
【図２５】



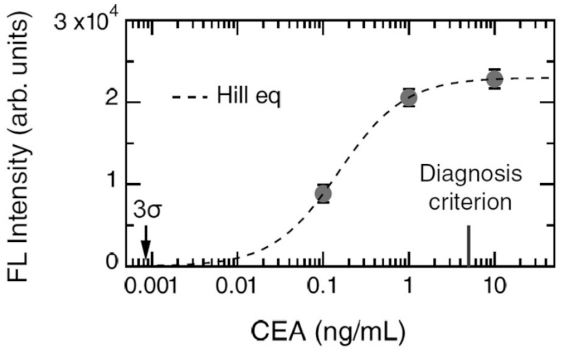
【図２６】



【図２７】


CEA 0.1 ng/mL
1 ng/mL
10 ng/mL

【図２８】


FL Intensity (arb. units)
3 x10^4
2
1
0
Hill eq
3σ
Diagnosis
criterion
0.001
0.01
0.1
1
10
CEA (ng/mL)

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第２０１２／１２０８７４（WO，Ａ１）
特開２００５－１４０６８２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１２／０７０１７５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ２１／６４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）